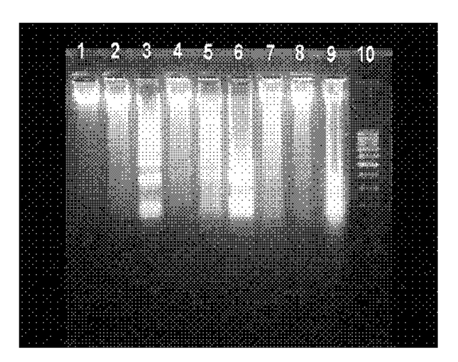
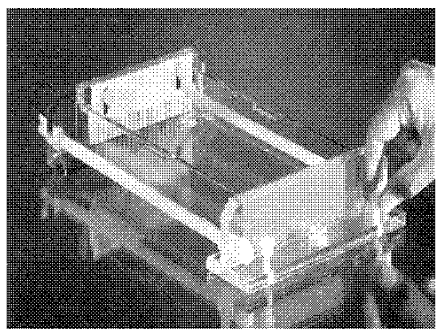
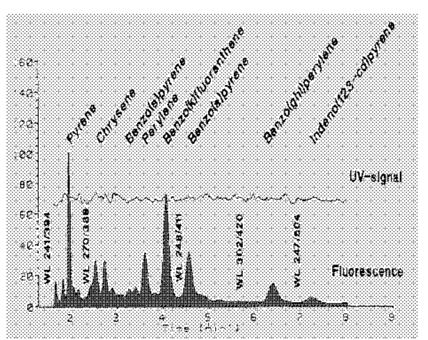
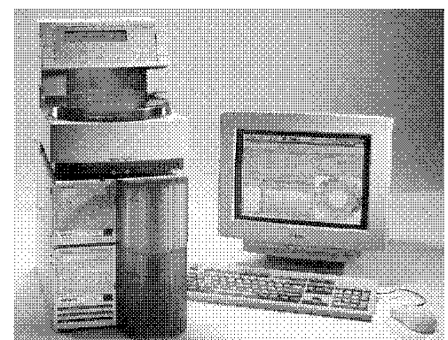








أجهزة علمية وطرق تحليل معملية

أستاذ دكتور

يوسف عبد العزيز الحسانين

أستاذ الكيمياء الحيوية والتغذية ووكيل الكلية للدراسات العليا والبحوث

كلية الاقتصاد المنزلى – جامعة المنوفية

٢٢٣

مقدمـــــــة

لقد تقدمت العلوم في العقدين الأخيرين تقدما مذهلا في جميع المجالات، فاكتشفت العديد من الأمراض الجديدة ، وفسرت الكثير من الخواص الجزيئية والبيولوجية للمادة الحية والتي لم تكن معروفة من قبل. ولقد صاحب كل هذه الاكتشافات جنبا إلى جنب، تقدما مذهلا في الأجهزة المعملية وطرق التحليل الآلي بواسطة العلماء والمهتمين بهذا الأمر. ولعل ذلك قد فرض على جميع الطلاب والباحثين بجميع الكليات العملية مثل الطب والصيدلة والعلوم والزراعة وغيرها، أن يكونوا على إلمام كامل بطرق التحليل الحديثة والأجهزة العلمية التي تستخدم في هذه التحاليل.

ونظرا لقلة المراجع العربية التي تناولت هذه الموضوعات، فقد قمت بتأليف هذا الكتاب ليشتمل على شرح وافى لمختلف الأجهزة العلمية التي تستخدم في فصل وتقدير المركبات الحيوية من حيث نظرية عملها وطرق تشغيلها والاحتياطات التي يجب مراعاتها عند الاستخدام للوصول إلى دقة عالية في القياس، هذا إضافة إلى شرحا مفصلا لأهم التقديرات الحيوية التي يمكن إجراؤها باستخدام كل جهاز والتى قمنا شخصيا بإجرائها معمليا من قبل. ولقد راعينا في ذلك اختيار المركبات التي تتكون منها أجسام الكائنات الحية وتلعب دورا هاما في التشخيص والعلاج للكثير من مظاهر الاعتلال والأمراض التي قد تصيب الجسم.

لذلك فإنى أطمع أن يحقق هذا الكتاب جزءا من الهدف المنشود منه وهو إشباع رغبات أبنائنا الدارسين بالكليات العملية في البحث والاستنتاج من خلال تشجيعهم على ممارسة التجارب العملية على أسس علمية واضحة ومفهومة، والتعرف على أهم وأكثر التقنيات الأساسية والحديثة في مجال الكيمياء الحيوية وفهم بعض الخواص

الجزيئية والبيولوجية للمادة الحية. وفى النهايـــة أدعــوا الله ســبحانه وتعالى أن يوفقنا جميعا إلى ما فيه الخير لخدمة أمتنا ورفعة أوطاننا.

المؤلف

أستاذ دكتور / يوسف عبد العزيز الحسانين

الباب الأول

طرق الأمن والسلامة في المختبرات وأهمية إتباعها
Laboratory Safety

طرق الأمن والسلامة في المختبرات وأهمية إتباعها

Laboratory Safety

من الضروري بصفة مستمرة ودورية التأكيد على احتياطات الأمن والسلامة في المختبرات، ومن الواجب أن يطلع المشرفون على المختبرات وكذلك العاملين بها على القوانين والتعليمات الخاصة بالسلامة. وبصفة عامة تنتج الحوادث في المعامل عن واحد أو أكثر من الأسباب التالية:

١- **حدوث حريق:** غالبا ما يشب الحريق في المختبرات نتيجة استعمال المذيبات العضوية سريعة الاشتعال دون مراعاة احتياطات الأمان المتعلقة بهذا الخصوص والتى من أهمها عدم استخدام نار مكشوفة open fire بالقرب من هذه المذيبات.

٢- **حدوث انفجار:** ينبغي أن يؤخذ بعين الاعتبار احتمال حدوث انفجار بالمختبرات كلما وجدة أوعية تحتوى مكونات تحت ضغط مرتفع مثل اسطوانات الغازات المختلفة. كذلك يجب مراعاة الحذر الشديد عند استخدام المواد القابلة للانفجار مثل حامض البيركلوريك perchloric acid وأمثاله من الكيماويات الأخرى.

٣- **كسر الأدوات الزجاجية:** كثيرا ما تنشأ الجروح بسبب الزجاجات المعملية المكسورة وذلك عندما لا تكون الأنابيب الزجاجية مصنفرة بصورة جيدة مما يستلزم إدخالها فى فتحات ضيقة من المطاط المستعمل كغطاء لدورق ما، أو

عندما يطبق ضغط يدوى مرتفع على أحد الأدوات الزجاجية الرقيقة مثل الدوارق ، مما يتطلب استخدام القفازات أو فوط من القماش لحماية اليدين في حالة استعمالها للضغط على وعاء زجاجي.

٤- **التسرب أو التلوث بالمواد السامة:** تعتبر الأخطار الناجمة عن المواد السامة والأكالة toxic and corrosive substances من أكبر الأخطار التي يتعرض لها العاملين بالمختبرات الحيوية، حيث تؤثر تلك المواد على أنسجة وأعضاء الجسم المختلفة. فعلى سبيل المثال عندما يصل شئ من هذه المواد مثل حامض الكبريتيك مثلا المركز إلى الجلد أو الفم أو العين فإن نتائج الحروق تتعلق بصورة رئيسية على طبيعة المعالجة والإسعافات الأولية التي تتم لهذه الحروق وسرعة إجراؤها.

وقبل أن نعرف الطالب على كيفية معالجة حالات الطوارئ السابقة فإنه يجب أولا تجهيز المختبرات **بصيدليات للإسعافات الأولية،** توضع في المخصص لذلك بداخل المعمل وتحتوى على المواد التالية:

- بطانية ضد الحريق وتحفظ في مكان خاص ملحق بصيدلية الإسعافات الأولية.
- ضمادات مختلفة الأحجام عبارة عن شاش من القطن والكتان والحرير.
- أشرطة لاصقة Elastoplast.
- ملقط دقيق وإبر وخيط ومقص ودبابيس.
- قطارة دقيقة.

- مرهم بكرات البيوتسين ومستحلب الأكريفلافين.
- فازلين وزيت خروع ومحلول الأمونيا المركز ومسحوق حامض البوريك ومسحوق كربونات الصوديوم ومسحوق السلفاديميرين وحبوب الإوكالبتس Eucalyptous pastilles.
- هلام حامض التانيك Tannafax وهلام الأكريفلافين Acreflaven.
- زجاجات تحتوى على محلول ١ % حامض بوريك، محلول ١% حامض خليك، محلول ١% بيكربونات الصوديوم، كحول ايثيلى، جليسرين، مطهر مثل الديتول Dettol ، محلول ١% كلورامين.

معالجة حالات الطوارئ بالمختبرات

أولا: معالجة الحروق

يتم معالجة حروق الجلد الناتجة عن الأحماض أو القواعد المركزة على النحو التالي:

- تغسل المنطقة المحروقة بصب كميات كبيرة من الماء البارد عليها ويفضل أن يتم ذلك تحت صنبور مار جارى.
- في حالة الحروق الحمضية فتغسل المنطقة المصابة بمحلول قاعدة ضعيفة مثل بيكربونات الصوديوم ١%، بينما فى حالة الحروق القاعدية فتغسل بمحلول حامض ضعيف مثل حمض الخليك ١%، ثم يعقب ذلك الغسيل بكمية كافية من الماء البارد.
- يطهر مكان الحرق بأحد المطهرات ثم يجفف الجلد ويغطى بطبقة من هلام الأكرفلافين.

- في حالة الحروق الناتجة عن المواد العضوية فيغسل الجلد بالكحول ثم بالصابون والماء الفاتر.

ثانيا: معالجة حوادث العين

يتم عمل الإسعافات الأولية في حالات إصابة العين بداخل المختبرات على النحو التالي:

- في حالة إصابة العين بمحلول حامضى مركز فتغسل بكمية كبيرة من الماء البارد ثم بمحلول بيكربونات الصوديوم ١%، أما فى حالة الإصابة بمحلول حامضى مخفف فتغسل بمحلول ١% بيكربونات الصوديوم مباشرة.
- في حالة إصابة العين بمحلول قاعدي مركز فتغسل بكمية كبيرة من الماء البارد ثم بمحلول حامض بوريك ١%، أما في حالة الإصابة بمحلول قاعدي مخفف فتغسل بمحلول ١% حامض بوريك مباشرة.
- في حالة تناثر قطع الزجاج المكسور بداخل العين فينبغي إزالة قطع الزجاج بحذر شديد باستخدام الملقط المخصص لذلك ثم تغسل العين بالماء مع وضع نقط من زيت الخروع لتخفيف الآلام الناتجة عن إصابة العين على أن يتم عرض المصاب على الطبيب المختص فور إجراء الإسعافات الأولية.

ثالثا: معالجة الجروح

تعالج الجروح الناتجة عن كسر الزجاجات على النحو التالي:

- إذا كان الجرح صغير فيترك لينزف لبضع ثوان مع ضرورة التخلص من بقايا الزجاج بالجلد باستخدام الإبر المعقمة لهذا الغرض، ثم يطهر الجرح بالكحول أو الديتول ١% أو

مسحوق السلفاديميرين ويلف بشاش معقمة.

- إذا كان الجرح غائر وغير سطحي فينقل المصاب إلى أقرب مستشفى في الحال لعمل الإسعافات اللازمة.

رابعا: معالجة المواد السامة

من أكثر ما يتعرض له المشتغل بالمختبرات الحيوية التعرض للتسمم بالمواد السامة إذا لم يراعى الاحتياطات المتعلقة بهذا الخصوص، ويتم إسعاف المصاب مبدئيا على النحو التالي:

- إذا وصلت المواد السامة إلى الفم ولم يتم بلعها فيغسل الفم في الحال بواسطة الماء لمرات عديدة.
- إذا وصلت المادة السامة إلى المعدة فيجب استدعاء الطبيب فى الحال أو الانتقال إلى أقرب مركز طبي متخصص في علاج السموم مع إعطاء المصاب مبدئيا جرعة ضد المادة السامة والتى تختلف على حسب طبيعة المادة السامة فمثلا:
- إذا كانت المادة السامة أحماض فتخفف بشرب كميات كبيرة من الماء مصحوبة بماء الجير ويعطى الحليب بكثرة ولا تعطى مقيئات.
- إذا كانت المادة السامة قلويات كاوية فتخفف بشرب كميات كبيرة من الماء مصحوبة بالخل ويعطى عصير الليمون أو البرتقال بكثرة ولا تعطى مقيئات.
- إذا كانت المادة السامة مركبات الزرنيخ أو الزئبق تعطى مقيئات في الحال مثل ملعقة شاي واحدة من الخردل وملعقة كبيرة من ملح الطعام مذابة في كوب ماء دافئ.
- إذا كانت المادة السامة غاز مثل الكلور أو البروم فيبعد المصاب عن جو الغاز إلى الهواء الطلق وتفك الأربطة حول

العنق ويتم استنشاق أبخرة النشادر أو الغرغرة بمحلول بيكربونات الصوديوم ثم يأخذ المريض حبات الإوكالبتس أو يشرب روح النعناع أو القرفة المخففة لحماية الحنجرة والرئتان. وفى حالة الاختناق الشديد فيتم عمل التنفس الاصطناعي في الحال.

خامسا: معالجة الحريق

- يتم أولا في حال إصابة أحد المشتغلين بالمختبرات باشتعال الملابس فيمنع المصاب من الجري ثم يلف ببطانية مقاومة للحريق لمنه التهوية وحتى تنطفئ النار.
- يتم ثانيا إطفاء الحريق بالطرق المناسبة والتى تتوقف على حسب حجمة ونوعه على النحو التالي:
- إذا كان الحرق صغيرا كما هو الحال عند احتراق محلول فى كأس أو حمام زيتي فإنه يطفأ بالتغطية بقطعة من القماش مبللة بالماء لعزل الهواء أو استعمال مضخات إطفاء الحريق الممتلئة بغاز رابع كلوريد الكربون والتى توجه مباشرة إلى مكان الحريق ويخمد الحريق في الحال.
- إذا كان الحرق كبيرا فستخدم جرادل الرمل الموجودة بالمعمل لتغطية الأماكن المشتعلة بالمختبر.

كما يجب أن تراعى النقاط التالية أثناء عمليات إطفاء الحريق:

- يجب تهوية المختبر فورا بعد إخماد النار للتخلص من الأبخرة السامة الناتجة عن الاحتراق مثل أول أكسيد الكربون والفوسجين وخلافة.
- يجب عدم استعمال مضخات إطفاء رابع كلوريد الكربون إذا ما كانت المادة المشتعلة صوديوم أو بوتاسيوم.

- عدم استعمال الماء عند إخماد الحريق الناتج عن المذيبات العضوية لان ذلك يساعد على انتشار الغاز بل يفضل استخدام مخلوط الرمل مع كربونات الصوديوم.

سادسا: الأمن الإشعاعي Radiation safety

يجب اتخاذ جميع التدابير والاحتياطات المعملية الكافية لتلافى العديد من المخاطر الناجمة من استخدام النظائر المشعة في التجارب الحيوية، خاصة وأن هذه الإشعاعات لا ترى بالعين المجردة ولا يظهر تأثيرها في الحال بل يظهر على المد البعيد، وعندئذ لا يمكن تلافيه. ويمكن تلخيص تلك الاحتياطات في النقاط التالية:

١- يحظر ملامسة أي من المواد المشعة بالجلد مباشرة وخاصة إذا كان هناك بعض الجروح بالجسم.

٢- يجب تفادى استنشاق تلك المواد المشعة نظرا لحساسية الرئة لهذه المواد وصعوبة إزالة التأثير الناتج عن ذلك.

٣- استخدام أجهزة الإنذار وعمل دراسات المسح الشامل للأماكن التي تستخدم فيها المواد الإشعاعية بالمعمل لتحديد مستوى النشاط الإشعاعي ومستوى الاحتياطات المطلوبة.

٤- العمل بداخل كبائن مخصصة لهذا الغرض بداخل المعمل لسهولة تنظيفها وتطبيق كل أساليب الاحتياط بداخلها.

٥- وضع العلامات والإشارات التحذيرية التي ترشد عن استخدام مواد مشعة على المعمل من الخارج وعلى كابينة العمل بداخل المعمل.

٦- يفضل تخصيص أدوات معملية للتجارب التي يستخدم فيها مواد مشعة مثل الماصات الأتوماتيكية وأجهزة الطرد المركزي...الخ ويلصق عليها الإشارة الدالة على ذلك. كما يحتم الأمر استخدام الزجاجيان في مثل هذه التجارب لمرة واحدة Disposal.

٧- يجب طلب المساعدة فورا عند حدوث أي مشكلة أثناء العمل بالمواد المشعة، وكذلك إخطار الأفراد الآخرين والزائرين بأي خطر موجود.

وبالرغم مما سبق التنويه عنه فإنه يجب التأكيد على أن الوقاية خيرا من العلاج، وأنه باتباع الاحتياطات المعملية المناسبة من قبل الطلبة والمشرفين يمكن أن نتحاشى أغلب إن لم يكن كل الحوادث السابق التنويه عنها بداخل المختبرات.

قواعد واعتبارات عامة تتعلق بالمعمل

التحليل الحيوي هو تحليل طبيعي وكيميائي يجرى على العينات الحيوية والسوائل البيولوجية للكائنات المختلفة، ولذا فهو يلزمه ما يلزم التحاليل الطبيعية والكيميائية من دقة وحرص ونظافة مع الإلمام الكامل بكافة التفاصيل الخاصة بالأدوات والأجهزة المعملية لذلك فإن هناك بعض الإرشادات بخصوص استعمال بعض الأجهزة والأدوات المعملية والأكثر استعمالا في الطرق المعملية والتي سيرد شرحها فيما بعد .

أولا: نظافة الأدوات الزجاجية

يتم تنظيف الأدوات الزجاجية بماء الصنبور العادي ثم بمحلول الماء والصابون ثم عدة مرات بالماء العادي فإذا كان الإناء ما يـــزال غير نظيفا أوجب ذلك غسله بكمية كافية من محلول حامض الكروميك ذو الفاعلية العالية في الأكسدة (يحضر بإذابة ١٠ جرام مـــن ثـــاني كرومات البوتاسيوم فى ١٠٠ مل من حـــامض الكبريتيـــك المركـــز) ويظل هذا المحلول صالحا للاستخدام طالما كان محتفظا بلونه البنـــي المحمر وبعد الانتهاء من الغسيل بهذا المحلول يستلزم غـــسل الإنـــاء الزجاجي عدة مرات بالماء العادي وأخيرا بالماء المقطر.

ثانيا: ادوات قياس الحجم

المخبار: يمكن استخدام المخبار عند قياس أحجام المحاليـــل التـــي لا يلزم أخذها بدقة شديدة ويراعى أن يوضع المخبار على سطح معتدل ثابت بحيث يكون سطح المحلول عند القراءة في مستوى العين .

الماصة: تستخدم الماصات ذات الحجم الثابـــت (١-٢٥مـــل) لاخـــذ أحجام من المحاليل ذات حجم معين أما الماصات المدرجة فتـــستخدم لاخذ أحجام اقل من ٢٥ مل وحتى كسور من الملليلتر ويراعى ان لا ينفخ في الماصة بعد تفريغ الحجم منها ولكن يكتفي بملامسة طرفهـــا لجدار الإناء المنقول إليه المحلول .

السحاحة: تستخدم السحاحات في اخذ أحجام من المحاليل عن التنقيط ويراعى أن يفتح صنبور السحاحة لملـــئ اســـفل الـــصنبور بـــنفس المحلول مع تجنب تكوين فقاعات هوائية فى هذا الجزء وفـــى حالـــة

استخدام اى من الأدوات السابقة فى القياس فانه يلزم غسله بنفس المحلول الذي سيقاس أولا .

ثالثا: ملاحظات عامه

١- عند إجراء عملية الترشيح للحصول على راسب ما منفصلا عن المحلول الأصلي فانه يجب اختبار ورق الترشيح المناسب للقمع والعمل على أن تكون حبيبات الراسب بقطر اكبر من ١٠٠ ملليميكرون .

٢- تحسب نتائج التحليل عاده مقربه إلى الرقم العشري الرابع .

٣- تأكد من انك قد قرأت طريقه العمل كاملة وبمنتهى الدقة وذلك قبل البدء للعمل في أي تقدير وفى حالة كثرة عدد خطوات العمل يفضل قراءة طريقة العمل اكثر من مرة وتدوينها على هيئة أشكال توضيحية يرجع إليها باستمرار أثناء إجراء التقدير.

٤- يجب تدوين الملاحظات التي تقابلك أثناء سير العمل وبمنتهى الدقة فقد تكون إحداها عاملا هاما في معرفة سبب فشل او نجاح التقدير .

٥- تدون النتائج في كراسة الدروس العملية في الحال ويمكنك إجراء الكشط بالقلم في حالة حدوث أخطاء ولكن يفضل عدم استخدام الممحاة (الاستيكه) .

٦- يجب قراءة أسماء المحاليل المستخدمة بمنتهى الدقة والتأكد من أن المحاليل التي أمامك هي نفس المحاليل المطلوبة .

٧- يفضل التقيد بالازمنه المختلفة المنصوص عليها في خطوات العمل فهذه المدد اتفق عليها بعد خبرة وتجارب عديدة .

٨- حافظ على نظافة المعمل فهذا أمر ضروري لاستكمال مقومات العلم الدقيق وزود نفسك بالأدوات التي تلزم ذلك مثل فوط المسح وخلافه كذلك اترك مكانك نظيفا قبل مغادرة المعمل وتأكد من غلق مفاتيح الكهرباء والغاز وصنابير المياه.

الباب الثاني

الموازين الدقيقة ومقاييس درجة الحموضة

Balances and pH meter

الموازين الدقيقة ومقاييس درجة الحموضة

Balances and pH meter

الميزان الحساس Balance

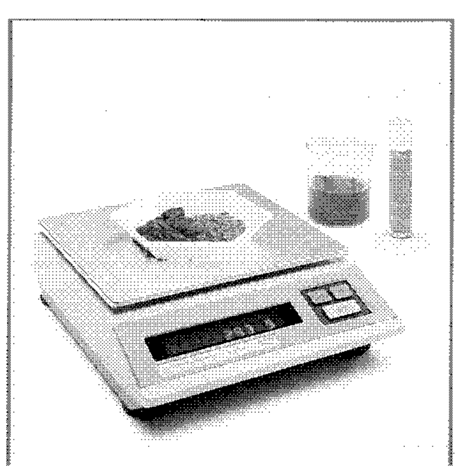
يعبر في كثير من الأحيان عن نتائج التحليل الكيماوي أو الحيوي بنسبة وزنيه مئوية، وعلى هذا فمن الضروري تحديد وزن عينة المادة المراد تحليلها وكذلك المادة التي انتهى إليها التحليل بكل دقة . ويعد الاستعمال الصحيح للميزان هو الوسيلة الأكيدة للوزن الدقيق، ولتحقيق ذلك تراعى بعض الاعتبارات الخاصة منها :

١- نظرا لأن الوزن الدقيق بأخذ وقتا كافيا فعلى ذلك يجب عدم البدء بالوزن في حالة ما إذا كان الشخص القائم بالوزن على عجل.

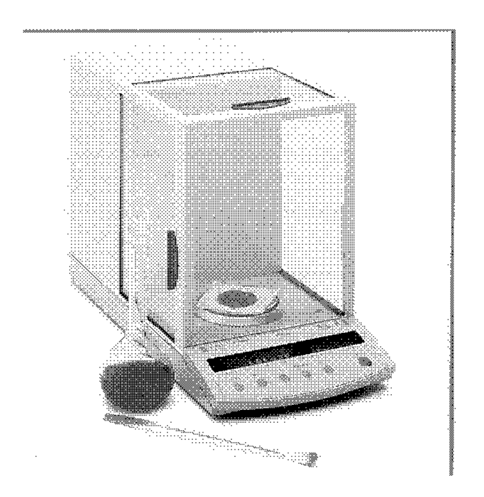
٢- يجب ضبط أفقية ومستوى الميزان قبل البدء في عملية الوزن علاوة على ذلك يراعى أن يوضع الميزان على مكان ثابت وليس على منضده وذلك لتلافى اثر الاهتزازات أو الذبذبات الأرضية .

٣- يجب تنظيف الميزان خاصة كفة الوزن بعناية شديدة بواسطة فرش الشعر الناعمة والمخصصة لهذا الغرض .

٤- يجب معرفة الحد الأقصى من الأوزان التي يتحملها الميزان وعدم الوصول لها إطلاقا أثناء إجراء عملية الوزن.



ميزان درجة حساسية ٠,٠١ جرام



ميزان درجة حساسية ٠,٠٠٠١ جرام

نماذج لموازيين حساسة معملية مختلفة الحمولة والدقة

٥- يجب عدم لمس الأجسام المراد وزنها بالأصابع ويستعمل دائما الماسك او الملقط المحدد لهذا الغرض فى مسكها .

٦- يجب إغلاق الأبواب الجانبية للميزان أثناء إجراء عملية الوزن وذلك حتى لا يتعرض الميزان لتيارات هوائية تؤثر على دقة الوزن .

٧- يمنع إطلاقا وزن أي عينات غذائية أو كيماويات على كفة الميزان مباشرة بل يجب استخدام العلب البلاستيك او القطع الورقية المخصصة لهذا الغرض.

٨- يحسن أداء الوزن بسرعة بقدر الإمكان حتى لا تترك فرصة لتراكم الرطوبة الجوية على المادة الموزونة خاصة إذا ما كانت مادة جافة مما يؤدى ذلك إلى تغير في وزنها .

٩- يجب عدم وزن اى مادة وهى ساخنة او دافئة بل يجب وضعها في المجفف أولا حتى تبرد تماما .

١٠- يجب التعامل مع الموازين الحساسة بكل لطف وهدوء ودقه حيث أنها أجهزه على درجه كبيره من الحساسية وبالغة الثمن.

١١- يحسن دائما الحصول على قراءة الميزان حتى الرقم العشري الرابع .

١٢- يجب تنظيف الميزان بالطريقة المناسبة مباشرة عقب الانتهاء من الوزن والتأكد من أن كفه الميزان خاليه من أي شئ نتيجة الوزن .

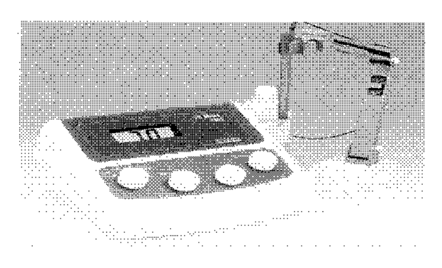
ولقد شملت التكنولوجيا العصرية الموازين، وأصبح الميـزان ذو القب والكفتان غير مستعمل تقريبا في المختبرات لانتـشار المـوازين الكهربائية ذات الحمولات والحساسيات المختلفة والتى بمجـرد ضـع العينة يظهر الوزن مباشرة في ظرف ٢ ثانية. كما أن هناك مـوازين تقرأ حتى خامس رقم عشري من الجرام أي ١٠ ميكروجرام.

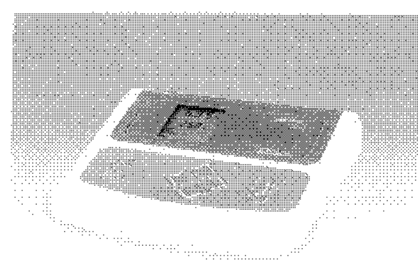
مقاييس درجة الحموضة.. pH meter

يستخدم جهاز الـــ pH في ضبط الرقم الهيـدروجيني لغالبيـة المحاليل المنظمة المستخدمة في مجال الكيمياء الحيوية والفسيولوجيه، حيث يتم ذلك على مرحلتين :

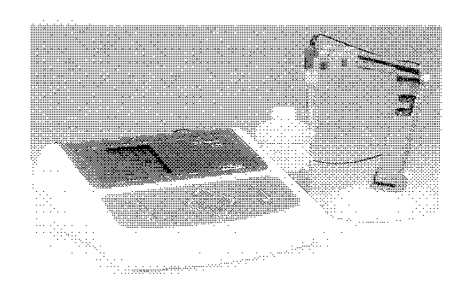
<u>أولا</u>.. يتم فيها ضبط الجهاز قياسيا وذلك باستخدام المحاليل المنظمـة المعروف رقمها الهيدروجيني بالضبط والتى تتكون من:

- محلول رقمه الهيدروجيني ٧ وذلـك لـضبط الجهـاز عنـد مستوى التعادل .
- محلول رقمه الهيدروجيني ٤ وذلك لضبط الجهاز لقياس pH المحاليل الحامضية
- محلول رقمه الهيدروجيني ٩ وذلك لضبط الجهاز لقياس pH المحاليل القاعدية .





نماذج لمقاييس درجة الحموضة
pH meter



ثانيا.. يستعمل فيها الجهاز الذي تم ضبطه قياسيا في قياس الرقم الهيدروجيني للمحاليل المجهولة .

خطوات العمل:

١- اضبط جهاز الـــ pH الموجود أمامك إلى التدريج صفر مستخدما المفتاح الخاص بذلك .

٢- اضبط درجة حرارة الجهاز لينطبق على الرقم المقابل لدرجة حرارة المحلول .

٣- اغمس الألكترود المغسول بالماء المقطر في المحلول المنظم القياسي (pH = ٧) لضبط الجهاز عند مستوى التعادل

٤- اختار التدريج الذي سيتم في نطاقة القياس (النطاق الحامضى أو القاعدي) وذلك بالاستعانة بالمحاليل المنظمة القياسية (pH=٤) ، (pH = ٩) وكذلك مفتاح الجهاز المدون عليه كلمة Buffer لضبط الجهاز إلى الرقم المقابل للرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم المعلوم الـــpH ، وبذلك يكون الجهاز معدا لقياس الرقم الأيدروجينى لأي محلول مجهول .

٥- انزع الألكترود من المحلول المنظم واغسله بالماء المقطر ثم ضعه في المحلول المراد قياس رقمه الهيدروجيني وتؤخذ قراءة الجهاز والتى تمثل في هذه الحالة رقم الـــ pH لذلك المحلول .

٦- بعد الانتهاء من القياس اغسل الإلكترود بالماء المقطر ثم اتركه مغموسا دائما فى كأس به ماء مقطر حتى إجراء قياس آخر .

احتياطات هامة يجب مراعاتها عنـد قيـاس الـرقم الهيـدروجيني بواسطة الـ pH meter

أولا : في حالة استخدام إلكترود جديد أو في حالة تخـزين الإلكتـرود لفترة طويلة دون استخدام فإنه يجب غمسه أولا في محلول مـن حامض الهيدروكلوريك ٠,١ مولر لفترة وجيزة أو في ماء مقطر عدة ساعات قبل الاستخدام. كذلك يجب غسل الإلكتـرود جيـدا بالماء المقطر قبل وبعد الاستخدام مباشرة .

ثانيا : يراعى ضبط الجهاز باسـتخدام المحاليـل المنظمـة القياسـية والمعروف رقمهـا الهيـدروجيني مثـل فثـالات البوتاسـيوم الهيدروجينية Potassium hydrogen phthalate التي تركيزها ٠,٠٥ مولر والتى يكون رقمها الهيدروجيني مساويا ٤ عند درجة حرارة ١٥ درجة مئوي .

- يحضر محلول فثالات البوتاسيوم الهيدروجينيـة Potassium hydrogen phthalate القياسي ٠,٠٥ مولر بإذابة ١٠,٢ جم مـن هذه المادة فى لتر من الماء المقطر. ومن الممكن حساب الـرقم الهيدروجيني لهذا المحلول عند درجات حرارة مختلفة تبدأ مـن صفر وحتى ٦٠ درجة مئوية وذلك باستخدام المعادلة التالية :

$$pH = ٤,٠ + \frac{1}{2} \left(\frac{Temperature - ١٥}{١٠٠} \right)^{٢}$$

- كذلك يمكن استخدام محلول قياسي من مادة البوراكس Borax (رابع بورات الصوديوم) بتركيز ٠،٠٥ مولر وذلك بإذابة ١٩,٠٧ جرام من البوراكس $Na_2B_4O_7 . 10\ H_2O$ في لتر من الماء المقطر حيث يكون رقمه الهيدروجيني ٩,٢٢ عند درجة حرارة ٢٠ درجة مئوية أو ٩,٠٨ عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية .

ثالثا : يراعى عدم فصل الكهرباء عن الجهاز في حالة عدم استخدامه لفترات وجيزة حيث يضبط مفتاح الجهاز على وضع الـ Stand by مع حفظ الألكترود في ماء مقطر في حالة عدم استخدام الجهاز .

الباب الثالث

أخذ العينات من إخراجات الجسم وسوائله للتحليل

Biological fluids sampling

أخذ العينات من إخراجات الجسم وسوائله للتحليل

Biological fluids sampling

تتأثر قيم التقديرات المختلفة لإخراجات الجسم وفـــى الأنـــسجة البيولوجية طبقا لعوامل عديدة منها: مكان أخذ العينات ، مدى تمثيـــل العينة، حالة الكائن من حيث تغذيته وصحته ومعاملته وإذا مـــا كـــان واقعا تحت ضغوط متباينة.

عينات الدم

قد تؤخذ عينات الدم من أوردة الأذن والذيل والجنـــاح والعنـــق والساق، أو من القلب مباشرة كما هو الحال في الكتاكيـــت والفئـــران، وذلك حسب نوع الحيوان وحجم العينة المطلوبـــة للتحليـــل. وتتـــأثر مكونات الدم بالعوامل التالية:

١- استخدام بعض المهدئات أو مواد التخدير قبل سحب عينات الـــدم من الحيوانات يؤثر على بعض مكونات الدم، لذل يتحرى الدقـــة إذا استخدمت هذه العقاقير، ومعرفة تأثيرها سلبا أو إيجابا علـــى مكونات الدم ووظائف الأعضاء، وذلك للحصول على قيم حقيقية لتركيزات مكونات الدم ومعرفة صورته الحقيقية.

٢- وقت أخذ العينة بالنسبة لوقت التغذية مـــن الأهميـــة بمكـــان، إذ تتغير تركيزات بعض مكونات الدم لحد ما بعد التغذية عنه قبلها أي بالصيام.

٣- الحالة التناسلية أو الفسيولوجية للحيوان قد تغير بعض مكونـــات الدم مثل الهرمونات والفيتامينات والمعادن وغيرها.

عينات البول

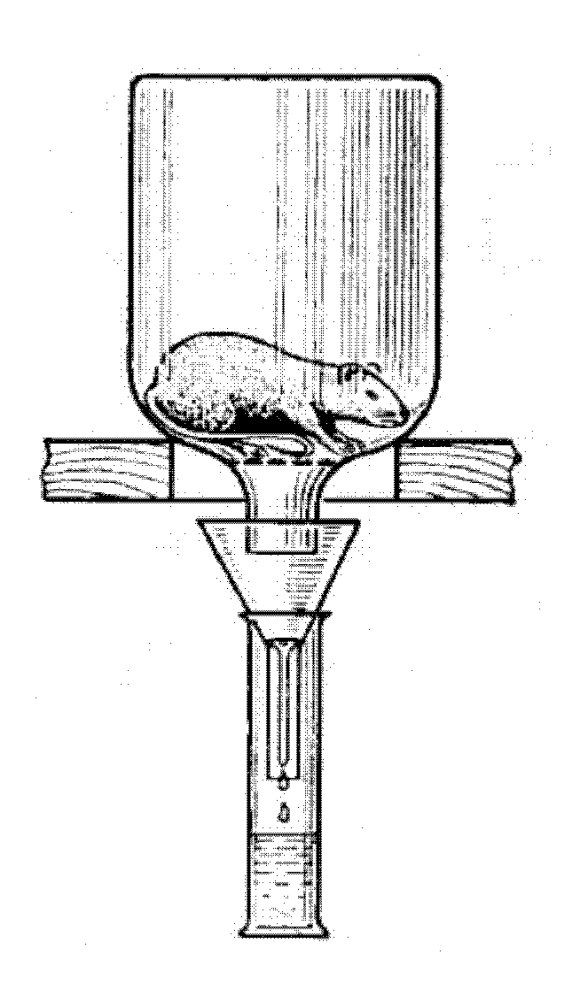
تشير مكونات البول الكمية إلى حالة وظائف الجسم المختلفة التي تتوقف على الحالة الغذائية والمرضية والفسيولوجية للحيوان. وعند تحليل عينات البول تراعى النقاط التالية:

١- لتحليل عينات البول يجمع البول المستخرج على مدار ٢٤ ساعة حيث تنسب مكونات البول دائما كتركيز ملليجرام/يوم.

٢- يفضل تحليل عينات البول فى الحال لبعض المكونات مثل الحموضة والكثافة النوعية والتى تتأثر كثيرا بالتخزين.

٣- تحفظ عينات البول التي تحلل على مدار ٢٤ ساعة لمنع التغيرات التي قد تطرأ علية بأحد المعاملات التالية:

- استقبال البول في زجاجة تحتوى على ١٠ مل حامض هيدروكلوريك مركز، أو ٥٠ مل من نفس الحامض تركيزه ٢ عياري، ويناسب ذلك تقديرات اليوريا والأمونيا والنتروجين الكلى والكالسيوم. وترج العينة قبل إجراء التحليل عليها نظرا لترسب حامض اليوريك.



طريقة مبسطة لجمع البول من حيوانات التجارب

استقبال البول في زجاجة تحتوى على محلول الثيمول ١٠% في كحول الأيزوبروبانول، ويناسب ذلك تقديرات الصوديوم والبوتاسيوم والكلور والبيكربونات والكالسيوم والفوسفور واليوريا والأمونيا والأحماض الأمينية والكرياتين والكرياتينين والبروتينات والأجسام الكيتونية والأميلاز.

- استقبال البول في زجاجة تحتوى على ٣-٤ نقط من الفورمالين المركز أو الكلوروفورم لكل ١٠٠ مل، ويؤثر ذلك على تقدير الجلوكوز.
- استقبال البول في زجاجة تحتوى على ٣-٤ نقط من حامض الخليك ١٠% أو حامض الميتافوسفوريك ٥% لكل ١٠٠ مل، ويناسب ذلك تقدير حامض الأسكوربيك.

الباب الرابع

فصل مكونات الدم والخلايا باستخدام أجهزة الطرد المركزي المبردة والفائقة السرعة

Separation of blood components and cellular fractions by high speed centrifuge and ultracentrifuge

فصل مكونات الدم والخلايا باستخدام أجهزة الطرد المركزي المبردة والفائقة السرعة

Separation of blood components and cellular fractions by high speed centrifuge and ultracentrifuge

أولا: فصل مكونات الدم باستخدام أجهزة الطرد المركزي العادية

Separation of blood components by centrifugation

١- فصل البلازما Plasma separation

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب جمع الدم
- جهاز طرد مركزي
- ماصة ميكرومترية ١٠٠٠ ميكروليتر

المحاليل اللازمة:

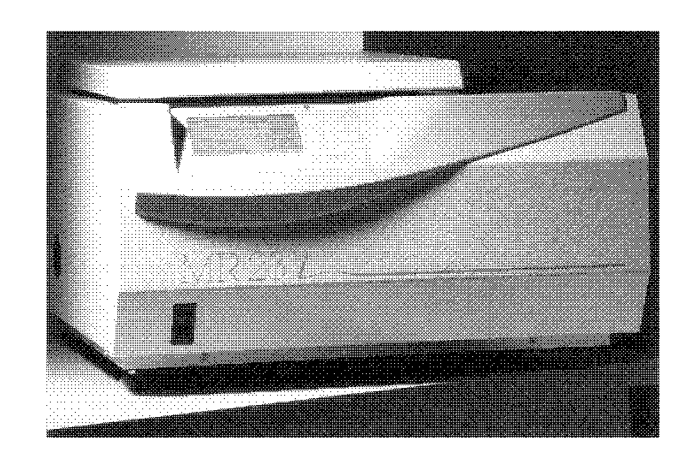
مانع للتجلط Anticoagulant كالهيبارين أو سترات الليثيوم أو الصوديوم أو أكسالات الليثيوم أو الصوديوم أو البوتاسيوم.

خطوات العمل:

١- تسحب عينات الدم في أنابيب تحتوى على مانع للتجلط بتركيز ٠,٢ مجم هيبارين/مل دم (٥٠-٧٥ وحدة/مل دم) أو ٥ ملجم سترات /مل أو ١-٢ ملجم أوكسالات/مل.

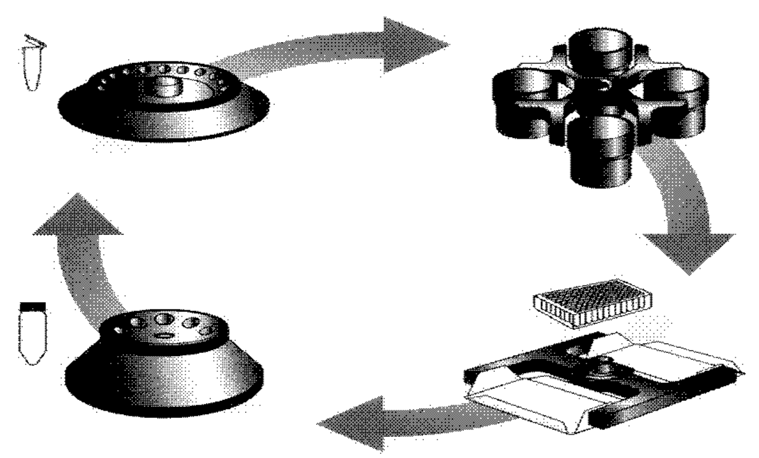


جهاز طرد مركزي عادى



جهاز طرد مركزي عالي السرعة





رؤوس لجهاز الطرد المركزي تناسب مختلف التطبيقات المعملية

٢- تنقل الأنابيب في الحال إلى جهاز الطرد المركـــزي ويـــشغل الجهاز على سرعة ٢٠٠٠-٢٥٠٠ لفة/دقيقة ولمـــدة ١٥-٢٠ دقيقة لفصل البلازما.

٣- تسحب البلازما بماصة ميكرومترية إلى أنبوبة أخرى نظيفـــة للتحليل أو للحفظ بالتجميد.

ملحوظات هامة:

يراعى عند اختيار مانع التجلط الآتي:

- ألا يتداخل مع التقدير المستهدف إجراؤه، فعلى سبيل المثـــال لا ينبغي استخدام أكسالات الأمونيوم عند استخدام عينة الـــدم لتقدير الأمونيـــا أو اليوريـــاز أو اليوريـــا أو البـــروتين أو النتروجين الغير بروتيني.
- لا ينبغي زيادة الكمية من مانع التجلط حيث أن ذلـــك يـــؤثر على توزيع الماء بين الخلايا والبلازما، ويؤثر ذلـــك علـــى بعض التقديرات.

٢ - فصل السيرم Serum separation

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب جمع الدم
- ماصة ميكرومترية ١٠٠٠ ميكروليتر

خطوات العمل:

١- تسحب عينات الدم في أنابيب بدون مانع للتجلط ثم تترك ليتجلط الدم سواءا فى درجات الحرارة العادية أو بداخل الثلاجة.

٢- يسحب رائق السيرم بحذر بماصة ميكرومترية وينقل إلى أنبوبة أخرى نظيفة للتحليل أو للحفظ بالتجميد.

ملحوظات هامة:

- قد يستعان بجهاز الطرد المركزي لتأكيد فصل رائق السيرم عن باقي المكونات ، حيث توضع فيه العينات بعد تجلطها على سرعة ٢٠٠٠-٢٥٠٠ لفة/دقيقة ولمدة ٥ دقائق.
- عينات السيرم ذو اللون الأحمر (دليل على تحللها Hemolysis) لا تستخدم لتقدير المعادن خاصة الحديد والزنك والماغنسيوم والبوتاسيوم، حيث أنها تكون مرتفعة القيم. كما أن العينات شديدة التحلل يكون محتواها من الفوسفور أعلى من الواقع.

٣- فصل كرات الدم الحمراء والأغشية الخلوية الخاصة بها
Erythrocyte membranes separation

المقدمة:

كثيرا ما يتطلب الأمر فصل الأغشية الخلوية لكرات الدم الحمراء Erythrocyte membranes بغرض إجراء العديد من التقديرات الحيوية الهامة التى تتعلق بالحالات المرضية المختلفة. فعلى سبيل المثال، تقدر الأكسدة الفوقية للدهون Lipid peroxide oxidation ، والنشاط الخاص بالإنزيمات المضادة للأكسدة Antioxidative stress enzymes مثل الجلوتاثيون بيرأوكسيديز Glutathione perioxidase والجلوتاثيون ريدكتيز Glutathione reductase والسوبر أوكسيد دسميوتيز Super oxide dismutase والكاتاليزCatalase فى هذه الأغشية والتى تتأثر بالتدخين والشيخوخة ونقص المناعة والتعرض للملوثات المختلفة فى البيئة والغذاء.

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب جمع الدم
- جهاز طرد مركزي
- ماصة ميكرومترية
- ماصة باستير

المحاليل اللازمة:

- محلول مانع للتجلط Anticoagulant أكسالات الصوديوم ١,٣٤%.

- محلول منظم Tris-HCl ٠,٠٤ مولر
- محلــول مــوهر $Fe(NH_٤)_٢(SO_٤)_٢$ Mohr salt, ٠,٠٠٠٠٤ مولر ويحضر فى الحال.
- محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك TCA ٤٠%
- محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩%

خطوات العمل:

١- تسحب عينات الدم في أنابيب تحتوى علــى مــانع الــتجلط (أكسالات الصوديوم بنسبة حجمية ١٠ دم : ١ أكسالات).

٢- تنقل الأنابيب في الحال إلى جهاز الطرد المركزي ويــشغل الجهاز على سرعة ٣٠٠٠ لفــة/دقيقــة ولمــدة ٣٠ دقيقــة لترسيب كرات الدم الحمراء.

٣- تسحب السائل الطافي بماصــة ميكرومتريــة إلــى خــارج الأنبوبة ويجرى غسيل لكــرات الــدم الحمــراء ٣ مــرات باستخدام ٥ مل من محلول كلوريد الصوديوم في كــل مــرة وكذلك جهاز الطرد المركزي على سرعة ٢٥٠٠ لفة/دقيقــة ولمدة ٥ دقائق.

٤- ينقل ٠,٥ مل من راسب كرات الدم الحمراء إلى أنبوبة طرد مركزي نظيفة، ثم يضاف إليه حجم مماثل من الماء المقطر، ثم يترك المخلوط لمدة ٣٠ دقيقة حيث يتم التحلــل الكامــل Complete hemolysis

٥- يجرى طرد مركزي للعينة على سرعة ٣٠٠٠ لفـــة/دقيقـــة ولمد ٣٠ دقيقة، ثم ينقل السائل الطافي Supernatant liquid مع الطبقة الرماديـــة البينيـــة Grey-colored intermediate layer التي تمثل الأغشية الخلويـــة كـــرات الـــدم الحمـــراء المتحللة hemolyzed erythrocytes cell membrane إلـــى أنبوبة نظيفة باستخدام ماصة باستير حيـــث تجـــرى عليهـــا التحليلات المطلوبة أو تخزن بالتجميد.

ثانيا: فصل المكونات الخلوية باستخدام أجهزة الطرد المركزي المبردة والفائقة السرعة

Separation of cellular fractions by high speed centrifuge and ultracentrifuge

١- فصل الميتوكوندريا من كبد الفأر باستخدام أجهزة الطرد المركزي عالية السرعة

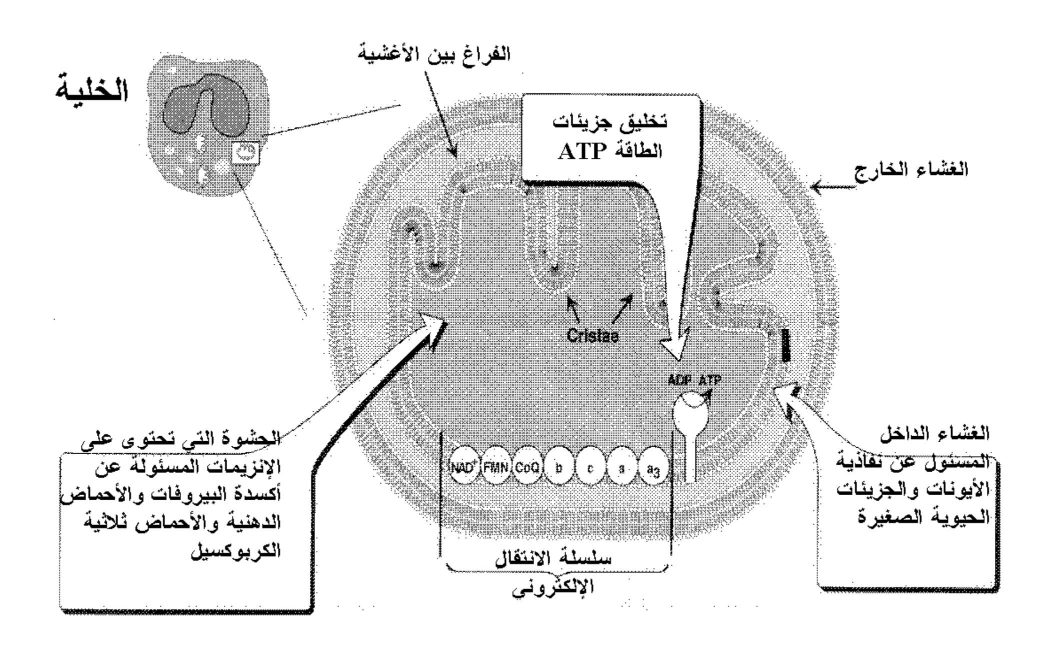
Preparation of rat liver mitochondria by high speed centrifugation

مقدمة:

تعد الميتوكوندريا واحدة من عضيات الخلية الهامة، والتى يحدث بداخلها تفاعلات السلسلة التنفسية electron transport chain وانتاج الطاقة oxidative phosphorylation . ويوضح الشكل التالي تركيب الميتوكوندريا ووظائف أجزاؤها المختلفة.

الأدوات المستخدمة:

- مجنس Homogenizer
- جهاز طرد مركزي عالي السرعة high speed centrifuge يعمل على ١٨٠٠٠ – ٢٤٠٠٠ لفة /دقيقة.
- أدوات تشريح.
- ماصات زجاجية بأحجام مختلفة.
- كاسات ودوارق ومخابير مدرجة بمقاسات مختلفة.
- أنابيب طرد مركزي.



تركيب الميتوكوندريا ووظائف أجزائها المختلفة

المحاليل اللازمة:

المحلول المنظم Buffer solution: يذاب ٠,٢٥ مـولر سـكر السكروز + ٥ ملليمولر محلول منظم Tris-HCl فى لتـر مـن المـاء المقطر مع ضبط درجة درجة pH إلى ٧,٤، ثم يضاف ١ ملليمـولر ايثلين داى أمينوتترا أسيتيك اسد (EDTA) إلى المحلول بهـدف منـع الأكسدة الفوقية للدهون أثناء الفصل. وتـستمر هـذه البيئـة صـالحة للاستخدام لعدة أسابيع إذا ما تم حفظها على درجة ٤ درجة مئوية.

خطوات العمل:

ملحوظة هامة: يراعى أن تتم المحافظة على درجة حرارة الأنـسجة وأجزاء الأنسجة في حدود صفر – ٤ درجة مئوية وذلـك باسـتخدام المحلول المنظم وهو على حالة باردة ومخابير الفصل وأنابيب الطرد المركزي تحفظ في صناديق من الثلج Ice box .

١- يخدر فأر وزنه ٢٠٠ – ٢٥٠ جرام ويشرح للحصول على الكبد والذى يزن تقريبا حوالى ١٠ جرام ، ثم يؤخذ الكبـد خارج الحيوان فور الذبح ويزال عنـه الأوعيـة الدمويـة والأنسجة الضامة العالقة ويوضع فى فـى ٧٠ مـل مـن المحلول المنظم المبرد.

٢- يغسل الكبد ٢-٣ مرة بواسطة المحلول المـنظم بغـرض إزالة الدم الزائد من الكبد قدر المستطاع، ثم يجفف برفـق بواسطة ورق نشاف مناسب، ثم يوزن ويسجل الوزن.

٣- ينقل الكبد إلى دورق جديد يحتوى على ٢٠-٣٠ مل مـن

المحلول المنظم ويتم تقطيعه بواسطة المقصات المبردة إلى أجزاء صغيرة حيث تؤدى تلك الخطوة إلى إزالة الدم نسبيا من الكبد على أن يستعمل في كل مرة محلول غسيل جديد.

٤- تنقل أجزاء الكبد إلى أنابيب إلى كــأس جهــاز التجنــيس المحاط بالثلج والذي يحتوى على ٣٠ مــل مــن المحلــول المنظم، ثم يدار الجهاز على سرعة ١١٠٠ لفة/ دقيقة لعدة دقائق حتى يتم تجنيس الكبد.

٥- يقسم مجنس الكبد الناتج بين أنبوبتين للطرد المركزي سعة ٥٠ مل ويتحوى كل منها على ٤٥ مل من المحلول المنظم البارد، ويضبط اتزان الجهار ويجرى الطرد المركزى لمدة ١٠ دقائق على سرعة ٢٠٠٠ لفة/دقيقة وعلى درجة حرارة ٤ درجة مئوية لإزالة الأنوية وخلايا كرات الدم الحمــراء وأجزاء الخلايا المتحطمة Debris فى الخثرة المتكونة فــى قاع الأنابيت Pellets .

٦- ينقل السائل الطافى Supernatant الى أنبــوبتين جديــدتين للطرد المركزى ويــضبط توازنهمــا باســتخدام المحلــول المنظم، ثم يجرى الطرد المركزى لمــدة ٧ دقــائق علــى سرعة ١٠٠٠٠ لفة/دقيقة ، حيث تترسب الميتوكونــدريا ى قاع الأنابيب على صورة Pellet تتميز بوجــود ٣ منــاطق رئيسية هى:

٧- الطبقة السفلية (HL) .. ولونها أبيض وأحمر وتحتوى على بقايا حطام الخلايا وكرات الدم الحمراء.

٨- الطبقة الوسطى (ML) .. ويتراوح لونها من البنى الفاتح وحتى البني الغامق وتحتوى على عضيات الميتوكوندريا الكاملة والليسوسومات.

٩- الطبقة العليا (LL) .. ويتراوح لونها من الأصفر الفاتح وحتى البني المحمر وتحتوى على الميتوكوندريا المتكسرة والميكروسومات.

١٠- يزال ١٠ مل من السائل الطافي ثم يحرك بحذر السائل المتبقي حول الخثرة لفصل الطبقة العلوية (LM) واستبعادها.

١١- يضاف ٥ مل من المحلول المنظم الى أنبوبة الطرد المركزي ثم تفصل أجزاء الطبقة الوسطى (ML) باستخدام ساق بلاستيكية أو زجاجية مبردة ، ثم تنقل إلى أنبوبة جديدة للطرد المركزي سعة ٥٠ مل مع إزالة أى ميتوكوندريا عالقة بجدران الأنابيب بالغسيل بكمية إضافية من المحلول المنظم مع مراعاة عد إحداث خلل Disturbance بالطبقة السفلية (HL) بالأنبوبة.

١٢- يضاف الى الأنبوبة كمية من المحلول المنظم ليصل الحجم النهائي إلى ٤٠ مل ثم تضرب الأنابيب باليد برفق بغرض نشر الميتوكوندريا في المحلول، ثم يجرى الطرد المركزي على سرعة ١٠٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.

١٣- يعاد فصل طبقة الميتوكوندريا الناتجة (ML) في أنابيب للطرد المركزي سعة ٥ مل مع إضافة ٢ مل من المحلول

المنظم مع إزالة أي ميتوكوندريا عالقة بجـدران الأنابيـب بالغسيل بكمية إضافية (١ مل) من المحلول المـنظم مـع مراعاة عد إحداث خلل Disturbance بالطبقة السفلية (HL) بالأنبوبة. ويكون العائد النهائي ٢-٣ مل من الميتوكوندريا ذات تركيز بروتيني مقداره ٣٠ ملليجرام/مل.

٢- فصل الأجزاء تحت الميتوكوندريا من كبد الفأر باستخدام أجهزة الطرد المركزي عالية السرعة

Preparation of rat liver submitochondrial particles by high speed centrifugation

مقدمة:

تتكون الأجزاء تحت الميتوكوندريا بواسطة الصعق الـصوتي Sonication للميتوكوندريا، والتى تحتوى على كل الإنزيمات المكونة للسلسلة التنفسية Oxidative phosphorylation بدون المـادة الخلويـة Matrix أو إنزيمات الأغشية الخارجية Outer membrane enzymes. وتتمثل أهميتها في دراسة عمليات أكسدة السلـسلة التنفـسية ونـشاط إنزيمات الطاقة ATP ase وتفاعلات أخرى كثيرة.

الأدوات المستخدمة:

- مجنس Homogenizer
- جهاز طرد مركزي عالي الـسرعة high speed centrifuge يعمل على ١٨٠٠٠ - ٢٤٠٠٠ لفة /دقيقة.
- أدوات تشريح.
- ماصات زجاجية بأحجام مختلفة.

- كاسات ودوارق ومخابير مدرجة بمقاسات مختلفة.
- أنابيب طرد مركزي.

المحاليل اللازمة:

المحلول المنظم Buffer solution: يذاب ٠,٢٥ مولر سكر السكروز + ٥ ملليمولر محلول منظم Tris-HCl فى لتر من الماء المقطر مع ضبط درجة درجة pH الى ٧,٤، ثم يضاف ١ ملليمولر ايثلين داى أمينوتترا أسيتيك اسد (EDTA) إلى المحلول بهدف منع الأكسدة الفوقية للدهون أثناء الفصل. وتستمر هذه البيئة صالحة للاستخدام لعدة أسابيع إذا ما تم حفظها على درجة ٤ درجة مئوية.

خطوات العمل:

ملحوظة هامة: يراعى أن تتم المحافظة على درجة حرارة الأنسجة وأجزاء الأنسجة في حدود صفر - ٤ درجة مئوية وذلك باستخدام المحلول المنظم وهو على حالة باردة ومخابير الفصل وأنابيب الطرد المركزي تحفظ في صناديق من الثلج Ice box .

١- تفصل الميتوكوندريا من خلايا كبد الفئران كما سبق شرحه بالتجربة السابقة، ثم يجرى طرد مركزي لخثره الميتوكوندريا المتكونة على سرعة ١٠٠٠٠ g لمدة ١٠ دقائق.

٢- يعاد نشر الميتوكوندريا Suspended الناتجة بعد إضافة المحلول المنظم ليصل التركيز النهائي إلي ٢٠ ملليجرام/مل تقريبا، ثم يجرى صعق صوتي Sonication للمحلول الناتج

لمدة ١ دقيقة (يراعى أن يوقف الجهاز للتبريد كل ١٥ ثانية ثم يعاد تشغيله).

٣- تخفف الميتوكوندريا الناتجة بضعف حجمها من المحلول المنظم، ثم يجرى لها الطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة على سرعة ١٤٠٠٠ لفة/دقيقة بهدف ترسيب الميتوكوندريا غير المتكسر وأجزاء الميتوكوندريا الكبيرة في الحجم.

٤- ينقل السائل الطافي Supernatant إلى أنابيب جديدة للطرد المركزي وتوضع في جهاز الطرد ويتم تشغيله على ١٠٠٠٠ g لمدة ٣٠ دقيقة حيث تتكون الأجزاء التحت ميتوكوندريا على شكل خثره Pellet حمراء اللون .

٥- يعاد تعليق الخثرة في حجم مماثل لها من المحلول المنظم ويكرر نفس الخطة السابقة، ثم يعاد نشر الخثرة المتكونة بإضافة المحلول المنظم ليكون التركيز النهائي ٢٠ ملليجرام/مل.

٣- فصل الأجزاء الميكروسومية باستخدام أجهزة الطرد المركزي فائقة السرعة

Preparation of microsomal fractions by ultra-centrifugation

مقدمة:

تعرف الأجزاء الميكروسومية Microsomal fraction للخلايا

بأنها الجـــزء الطـــافي فـــوق الميتوكونـــدريا Post-mitochondrial supernatant والذي يمكن ترسيبه بالطرد المركزي فـــائق الـــسرعة (١٠٠٠٠٠ –٢٥٠٠٠٠ g) لمدة ٦٠ – ١٢٠ دقيقة. وتعتمد الطبيعـــة المورفولوجية للخثرة الناتجة Pellet على شكل ونوع الخلايـــا التـــي تفصل منه، ولكن بالنسبة لخلايا الكبد فإنها تتكون من أجزاء الـــشبكة الإندوبلازمية الخشنة والناعمـــة Rough and smooth endoplasmic reticulum. وعلى عكس العـــضيات الـــبن خلويـــة الأخـــرى مثـــل الميتوكوندريا والليسوسومات، فـــإن الـــشبكة الإندوبلازميـــة تتمـــزق Disruption بكثافة بالتجنيس وتقترب الأجزاء الخلوية لتكون تجاويف مغلقـــة Closed vesicles أو الميكروســـومات Microsomes . هـــذه التجاويف تحتوى على الريبوسومات على سطحها الخارجي (إذا كانت مفصولة من الشبكة الإندوبلازمية الخشنة) حيـــث يتطـــابق الـــسطح الخارجي للغشاء الميكروسومى مع الـــسطح الـــسيتوبلازمى للـــشبكة الإندوبلازمية والتجويف السطحي من الداخل. وعلى حسب ما تـــسمح به طرق الفصل والتنقيـــة فـــأن الأجـــزاء الميكروســـومية للـــشبكه الإندوبلازمية لخلايا الكبد فى الفئـــران تحتـــوى علـــى ٢٠ % مـــن البروتين الخلوى الكلـــى، ٥٠% مـــن الفوســـفوليبيدات، ٦٠% مـــن الحامض النووى الريبوزى RNA على الترتيب. وعلى الرغم من أن الأجزاء الميكروسومية شكلا من أشكال النسيج المجنس Artefact الى أنها تحتوى على العديد من الإنزيمات التى تشملها عمليـــات التحـــول الحيوى للمواد الغريبة والسامة Xenobiotics التى تدخل الجسم مثـــل مجموعـــة انزيمـــات الـــسيتوكروم ب–٤٥٠ Cytochrome P٤٥٠ والأمين أوكسيديز Amine oxidases والجلوكورونيلترانسفيريز UDP-glucuronyltransferase.

الأدوات المستخدمة:

- مجنس Homogenizer
- جهاز طرد مركزي عالي السرعة high speed centrifuge يعمل على ١٨٠٠٠ – ٢٤٠٠٠ لفة /دقيقة.
- جهاز طرد مركزي فائق السرعة Ultracentrifuge يعمل على ٥٠٠٠٠ – ٧٥٠٠٠ لفة /دقيقة.
- أدوات تشريح.
- ماصات زجاجية بأحجام مختلفة.
- كاسات ودوارق ومخابير مدرجة بمقاسات مختلفة.
- أنابيب طرد مركزي.

المحاليل اللازمة:

بيئة التجنيس Homogenising medium : يذاب ٠,١٥٤ مولر (٧,٥ جرام/لتر) كلوريد بوتاسيوم + ٥٠ ملليمولر محلول منظم Tris-HCl فى لتر من الماء المقطر مع ضبط درجة درجة pH الى ٧,٤، ثم يضاف ١٠ ملليمولر ايثلين داى أمينوتترا أسيتيك اسد (EDTA) الى المحلول بهدف منع الأكسدة الفوقية للدهون أثناء الفصل. وتستمر هذه البيئة صالحة للاستخدام لمدة ١٢ أسبوع إذا ما تم حفظها على درجة ٤ درجة مئوية.

خطوات العمل:

ملحوظة هامة: يراعى أن تتم المحافظة على درجة حرارة الأنسجة وأجزاء الأنسجة في حدود صفر – ٤ درجة مئوية وذلك باستخدام

جميع بيئة التجنيس وهى على حالة باردة ومخابير الفـصل وأنابيـب الطرد المركزي تحفظ في صناديق من الثلج Ice box .

١- يتم ذبح حيوان التجارب (الفأر) مباشرة وذلك دون إجراء عملية التخدير Anesthetics بواسطة الأثير أو الباربتيورات لما هـو معروف عن تأثيرات تلك المركبات المباشـرة علـى الأنـشطة الأنزيمية المختلفة، ثم يؤخذ الكبد خارج الحيـوان فـور الـذبح ويزال عنه الأوعية الدموية والأنسجة الضامة العالقة ويضع فى بيئة التجنيس.

٢- يزال الدم الزائد من الكبد بغسيله اكثر من مرة باسـتخدام بيئـة التجنيس، ثم يجفف برفق بواسطة ورق نشاف مناسب، ثم يوزن ويسجل الوزن.

٣- ينقل الكبد إلى وعاء المجنس المحاط بالثلج ثم يضاف إليه بيئـة التجنيس بمعدل ٣ مل بيئة/جرام ثلج ويجنس جيدا. ويلاحظ أنـه فى حالة استخدام كبد الحيوانات الكبيرة فى الحجم مثل المجترات فإن ذلك يستلزم تقطيعه بواسطة المقصات المبردة إلـى أجـزاء صغيرة وتصفية الدم منه قبل وضعة في جهاز التجنيس. كـذلك قد يحتوى مجنس الكبد على كمية كبيرة من الأنسجة الضامة مما يستدعى إزالتها بالترشيح خلال منخل من النايلون Nylon mesh أو قطعة من الشاش الجراحي Surgical gauze .

٤- ينقل بحذر شديد مجنس الكبد إلى مخبار مدرج ثم يغـسل دورق جهاز التجنيس بالبيئة وتضاف إلى المخبار ثم يكمـل المخبـار بالبيئة ليصبح التركيز النهائي تقريبا ٠,٢٥ جرام نسيج/مل بيئة، ثم يخلط المخبار جيدا بقلبه لأسفل وأعلى عدة مرات.

٥- تنقل محتويات المخبار بحذر الى أنابيب جهاز الطرد المركــزي ويشغل الجهاز على ١٠٠٠٠ g لمدة ٢٠ دقيقــة علــى درجــة حرارة ٢-٤ درجة مئوية ، ثم ترفع الأنابيــب وينقــل الــسائل الطافي فوق الميتوكونــدريا Post-mitochondrial supernatant الناتج الى أنابيب طرد مركزي جديدة مبردة سابقا.

٦- توضع الأنابيب بداخل جهاز الطرد المركــزة فــائق الــسرعة ويشغل على سرعة ١٠٥٠٠٠ g لمدة واحــد ســاعة فتنفــصل الأجزاء الميكروسومية تاركة السيتوسول Cytosol في القاع على هيئة Pellet.

٧- تجرى عملية غسيل للميكروسومات وذلك بإعادة تعليقها فى حجم جديد من بيئة التجنيس وتطرد مركزيا على سرعة ١٠٥٠٠٠ g لمدة واحد ساعة.

٨- يزال السائل الطافي ويعاد نشر الميكروسومات المفــصولة فــي بيئة تجنيس جديدة لتعطى التركيز المناسب ثم يسجل هذا الحجم.

٩- تجرى حساب تركيز كل من النسيج المستخدم فــي الفــصل الميكروسومى (جرام نسيج /مل) للمجنس الكلى الطافي فوق الميتوكوندريا والأجزاء الميكروسومية على النحو التالي:

تركيز المجنس الكلى والطافي فوق الميتوكوندريا (جرام/مل) = $\frac{\text{وزن الكبد بالجرام}}{\text{حجم المجنس الكلى}}$

تركيز الأجزاء الميكروسومية (جرام/مل) =

الطافي فوق الميتوكوندريا (جرام/مل) × $\frac{\text{حجم الطافي فوق الميتوكوندريا (مل)}}{\text{حجم الأجزاء الميكروسومية (مل)}}$

ملحوظة هامة:

في أغلب الدراسات يتم استخدام الأجزاء الميكروسومية في نفس يوم فصلها، ولكن هناك العديد من الطرق التي تتبع في تخزين الأجزاء الميكروسومية حيث يتم عمل معلق منها في محلول ٠,١٥٤ مولر كلوريد بوتاسيوم يحتوى على ١٠ ملليمولر من المحلول المنظم HEPES-HCl ذات درجة حموضة (pH) ٧,٦ + ١ ملليمولر ايثلين داى أمينوتترا أسيتيك أسد (EDTA) + ٢٠ % جليسرول وذلك على درجة حرارة –٢٠ وحتى –٧٠ درجة مئوية أو يفضل في النتروجين السائل.

الباب الخامس

كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة

Thin Layer Chromatography (TLC)

كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة
Thin Layer Chromatography (TLC)

مقدمة:

يعد التحليل الكروماتوجرافى باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) من الطرق شائعة الاستعمال في مجال فصل المركبات وتنقيها وتقديرها كميا. حيث تتلخص نظرية العمل فى هذا النوع من التحليل على وضع العينات بعد تجهيزها في صورة سائلة على ألواح زجاجية مغطاة بطبقة رقيقة من الآلومينا أو السيلكاجيل ثم إجراء الجريان باستخدام المذيبات المناسبة، بعد ذلك يتم إظهار المركبات المفصولة والتعرف عليها وتقديرها كميا بالمقارنة بالعينات القياسية لنفس المركبات المفصولة.

أنواع الطبقات التي تستخدم في كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة:

١- الطبقات الصلبة Solid Layers :

حيث تلتصق المادة باللوح الزجاجي بواسطة عامل ربط مضاف إلى المادة المحملة.

٢- الطبقات الرخوة Loose Layers :

حيث يكون الالتصاق بين المادة واللوح الزجاجي من إحدى الصفات الطبيعية للمادة أي تلتصق باللوح الزجاجي بدون إضافة عامل ربط.

خطوات الفصل:

ويمر الفصل بطريقه الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة بالخطوات التالية:

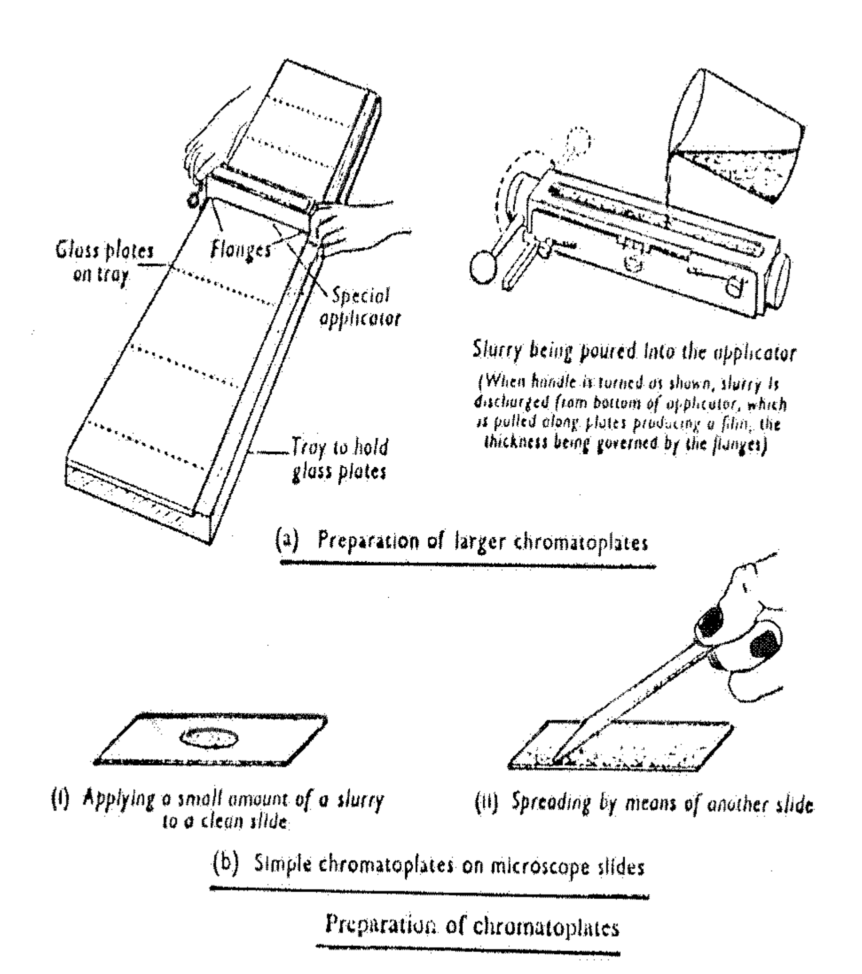
١ – تجهيز الألواح Preparation of chromoplates

أ– الطبقات الصلبة Solid Layers

يتم التجهيز بواسطة وضع طبقه متجانسة من المادة المناسبة في صوره معجون مائي رقيق على لوح زجاجي نظيف جدا ويتم ذلك بواسطة استخدام جهاز خاص يعطى السمك المطلوب Applicator ولضمان الحصول على افضل النتائج يجب التأكد من أن الطبقة الموضوعة متجانسة تماما من حيث حجم الجزيئات ، التركيب السطحي وكذلك التصاق المادة باللوح يجب أن تتم بعناية أيضا – وكل هذه المتطلبات يمكن الوصول إليها عن طريق استخدام منتج تجارى قياس معروف من المادة المطلوبة. ويتم تجفيف الطبقة على اللوح بواسطة التسخين في فرن درجه حرارته تتراوح بين ١٠٠ – ١٠٥ درجة مئوية لمده ساعتين وهذا يؤدى أيضا إلى عملية تنشيط للطبقة الرقيقة.

ب– الطبقات الرخوة Loose Layers

ويمكن عملها بواسطة عمود زجاجي طولي وفى نهايته توضع قطعتان من المطاط أو أنبوبة بلاستيك لتكون على شكل



Preparation of chromatoplates

تجهيز الألواح المستخدمة للفصل بطريقة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة

(TLC)

عجل محوري حيث تنشر المادة بإتقان على اللوح وباختبار سـمك أنبوبة المطاط يمكن عمل طبقات ذات سمك مختلف على اللوح.

٢- اختيار المادة على الألواح Choice of sorbent

غالبا أي مادة يمكن استخدامها لعمل الطبقة الرقيقة - والشائع من هذه المواد هي السيليكاجيل - الألومينا - السيليلوز - والمـواد ذات خاصية التبادل الأيونى وكل يوم يعرف أنواع اكثر اسـتعمالا وأساسا السيليكاجيل هي المادة الأكثر شـيوعا واسـتعمالا نظـرا لتكوينها طبقه لفـصل المركبـات القطبيـة بواسـطة التجزئـة والمركبات الغير قطبيه بواسطة الإدمصاص ومن أنواعها.

٣- اختيار المذيب Choice of solvent

يعتمد اختيار المذيب على طبيعة فصل المواد المراد فصلها والمادة التي سيفصل عليها. والمذيبات المستعملة في هذه الطريقة يمكن تجهيزها بالتشبع البسيط للمذيبات العضوية مثـل البيوتـان العادي بالماء وكثير من المذيبات الشائعة الاستعمال فى هذا النوع بل عديد منها يستخدم صوره سوائل او محاليل متضمنة كميه قليلة من الماء وذلك للمركبات القطبية (مثـل الأحمـاض الدهنيـة - السكريات - المركبات الفينوليه) حيث تتحرك ببطـيء لفـصل بعض الأنظمة المزدوجة ولإضافة مركب لآخر (أو مركبـات) فانه عاده ما يضاف إلى المخلوط أحد الأحمـاض او القواعـد او المركبات المعقدة مثل حمض الخليك أو الفورميك - البيريـدين - الأمونيا أو حمض الهيدروكلوريك حيث يؤدى ذلك وظيفتان :

- يسمحان بإضافة مزيد من الماء في المذيب .

- تؤدى إلى تحسين ذوبان بعض المواد .

وعندما تخلط المكونات معا فانه ينتج طبقتـــين إحـــداهما الطبقـــة العضوية التي تفصل وتستعمل كمذيب للجريـــان، **وميـــزة** هـــذه الطريقة أنها تؤدى إلى ضمان تشبع المذيب بالمـــاء، ولكـــن مـــن **عيوبها** أنها تؤدى إلى فقد كميات كبيره من المـــواد المـــستخدمة، وكذلك استهلاك وقت طويل في الإعداد.

٤- تجهيز العينات Samples for chromatography

تستخدم العينات دائما في صـــوره محلـــول أمـــا العينـــات الصلبة فلا بد من إذابتها في كمية قليلة مـــن المـــذيب المناســـب ومستخلصات الأنسجة النباتية أو الحيوانية فيتم تجهيزها بواســـطة الطحن في وجود المذيب ثم فصل المواد الغيـــر ذائبـــة بواســـطة الترشيح وبعد ذلك يمكن استخدام المـــستخلص مباشـــرة أو بعـــد تركيزه .

٥- وضع العينات على الألواح Samples application

يرسم خط موازى لحافه اللوح بالرصـــاص وعلـــى بعـــد مناسب منها توضع أعداد من النقط على مسافات متساوية يكـــون عددها مساوي للعينات المراد فصلها، ويكتب بـــالقلم الرصـــاص تحت كل نقطه نوع العينة. توضع نقطة من كل عينه في المكـــان المحدد لها وذلك باستعمال أنبوبة شعرية قصيرة أو باستعمال سلك من البلاتين، ويلاحظ أن استعمال سلك البلاتـــين يعطـــى فرصـــه لإضافة مزيد من العينة إذا تم غسله جيدا وتسخينه بشدة على لهب بنزن بعد كل استخدام، أما الأنبوبة الشعرية من الأفضل إهمالهـــا

بعد كل استخدام – يراعى ألا يزيد قطر كل بقعه عن ٥ ملليمترات فالبقعة ذات القطر الكبير تؤدى إلى فصل ضعيف، ويجب تحديد حجم البقعة بالقلم الرصاص قبل إضافة العينة يساعد في الحصول على بقعه ذات أقطار صغيره. ويسمح للمذيب المضاف إلى المواد بالتبخير من الطبقات الرقيقة حيث يكون التبخير أسرع، ولذلك لسنا في حاجه إلى مجفف للشعر أو أي جهاز يساعد على التبخر – عند إضافة عده نقط على نفس المنطقة يجب التبخير فيما بين الإضافتين المتتاليتين.

٥- تظهير الألواح Running

تجرى بالطريقة الصاعدة وفى تانك صغير حيث يوضع ثلاث أوراق مشبعه بالمذيب على ثلاث جوانب من التانك للتأكد من أن الجو الداخلي يكون مشبع ببخار المذيب ويغطى قاع التانك بعمق حوالي ٠,٥ – ١ سم بالمذيب – ويوضع الغطاء بإحكام في مكانه عندما يمر اللوح بمرحله التظهير. وعاده يسمح للمذيب الأمامي للصعود حوالي ١٠ سم قبل رفع اللوح من التانك – يعلم مكان المذيب بعنايته بواسطة قلم رصاص واضح. ثم يبخر المذيب من الطبقة في دقائق قليلة وعند ذلك يكون اللوح جاهز لتحديد موضع المركبات .

٤- تحديد المركبات على الألواح

Location of substances on plate chromatogram

يتم تحديد وضع المركبات المفصولة على الألواح، فإذا كانت المواد المفصولة ملونه فانه لا توجد صعوبة في تحديدها ولكن

كثيرا جدا من المركبات خاصة تلك المأخوذة من الأنسجة النباتيـــة أو الحيوانية تكون شفافة، وبالتالي فهي غير مرئية.

طرق الإظهار:

أولا: الطرق الطبيعية Physical methods

حيث يستخدم فيها بعض الخواص النوعية للمركبات المفــصولة مثل الوميض – النشاط الإشعاعي

١ – الوميض Fluorescence

كثير من المركبات العضوية الغير مشبعه لها خاصية الـــوميض بمعنى أن لها القدرة على امتصاص الأشعة فوق البنفــسجية UV أو الضوء البنفسجي القصير الموجه الغير مرئي، ثم يبعث هــذا الضوء على صوره ضوء مرئي (له موجــات أطــول) هــذه المركبات مع أنها غير مرئية على الورقة في الضوء العادي فانه يمكن إظهارها تحت لمبة UV وطول الموجه الناتج يكون أطول فبالتالي فان اللون يمكن رؤيته بوضوح.

٢ – النشاط الإشعاعي Radioactivity

وفيها يتم استخدام الطاقة النووية بواســطة اســتعمال النظــائر المشعة المرقمة حيث يتم إظهار البقعة باستخدام عدادات خاصـــة لقياس الإشعاع .

ثانيا: الطرق الكيميائية Chemical methods

وفيها يمكن تحويل المركبـــات المفــصولة علـــى اللـــوح والعديمة اللون إلى نواتج ملونه وذلك بالمعاملة ببعض الجـــواهر الكشافة التي يمكن إن تكون ببساطه عبارة عن غاز كما في حالة كبريتيد الأيدروجين لإظهار الأيونات المعدنيـــة حيـــث تعطـــى كبريتيدات ملونة. وطريقه الإظهار قد تتم في خطوة واحـــدة أو في عدة خطوات، وفى الحالة الأخيرة ينصح بتجفيف اللوح حتى ولو جزئيا بعد كل خطوه وقبل استعمال الخطوة التالية لها، وفى أحيان أخرى يكون التسخين ضروريا لإتمـــام التفاعـــل. ويـــتم إضافة محاليل الجواهر الكشافة إلى اللوح بعدة طرق منها:

- **طريقة الغمس The dipping technique**

يعد من أكثر طرق الغمس شيوعا طريقه إظهار الأحماض الأمينية حيث يستعمل فيها مادة Ninhydrin كجـــوهر كـــشاف وهى مادة ذات لون ابيض – صلبه وتستخدم بتركيز يتراوح بين ٠,١ – ٠,٢٥% في الأسيتون. فتغمس الورقـــة فـــي محلـــول الجوهر الكشاف وترفع ويسمح للأسيتون بالتطاير ثم تسخن فـــي

Ninhydrin
(colorless)

$+ H_2O$

H_3O^+

α-Amino acid

Aldimine

CO_2

Ketimine

H_2O

Intermediate amine

Ninhydrin

H_2O

NH_3

Ruheman's purple

Hydrindantin

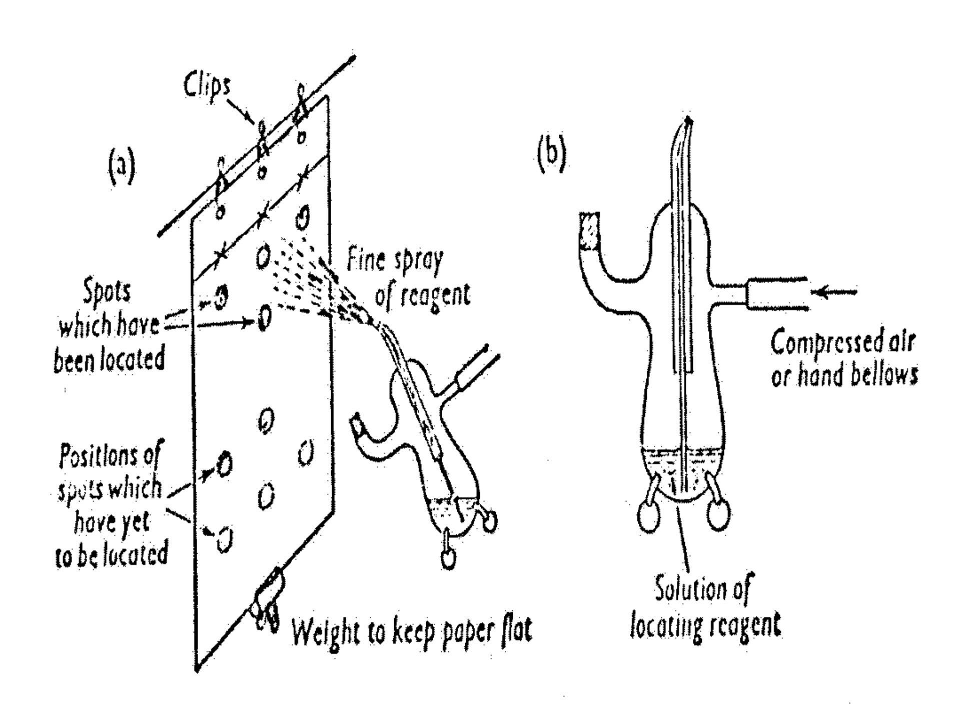
Ninhydrin

الطريقة الكيميائية اللونية لإظهار المركبات المفصولة على ألواح الكروماتوجرام (تفاعل النـنهيدرين مع الأحماض الأمينية لتكوين معقدات ملونـه)

فرن على درجه ١٠٠ درجة مئوية لفترة زمنية مـــن ٥ – ١٠ دقائق حتى يظهر اللون.

- **طريقة الرش The spraying technique**

وفيها يتم رش محلول الجوهر الكشاف على سطح اللـــوح الكروماتوجرافى بطريقة متجانسة وذلك باستخدام رشاش خاص يعمل بواسطة مضخة بدويه أو تيار من الهواء المضغوط ، وإذا كان الجوهر الكشاف المطلوب اســتخدامه علـــى مـــرتين فانـــه ببساطه يمكن استخدام واحد تلو الآخر ويراعى أن تجفف الطبقة بعد كل رشه.



إظهار المركبات المفصولة على ألواح الكروماتوجرام
بطريقة الرش (Spraying technique)

فصل فوسفوليبيدات أنسجة المخ باستخدام كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة
Separation of brain phospholipids by TLC

مقدمة

توجد الفوسفوليبيدات في جميع الأنسجة الحيوانية حيث تلعب دورا حيويا هاما في تمثيل الأحماض الدهنية Fatty acids metabolism . وتعد أنسجة المخ من أهم الأنسجة الدهنية التي تتكون أساسا من مشتقات الدهون المختلفة Fat derivatives بما فيها الفوسفوليبيدات. ويوضح الجدول التالي الأنواع المختلفة للفوسفوليبيدات وتركيبها الكيميائي. لذلك فسوف نقوم في هذه التجربة باستخلاص الأنواع المختلفة للفوسفوليبيدات من أنسجة مخ عجل حديث الذبح والتعرف على كل منها باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة.

أولا: استخلاص الفوسفوليبيدات من أنسجة المخ
Isolation of phospholipids from brain tissues

الأدوات المستخدمة:

- حمام مائي كهربي
- مجفف
- جهاز طرد مركزي
- خلاط كهربي Mixer

الأقسام المختلفة للفوسفوليبدات

The Common Classes of Glycerophospholipids

```
                          O
                          ‖
     O        CH2—O—C—R1
     ‖         |
R2—C—O—CH        O
               |          ‖
              CH2—O—P—O—X
                          |
                          O⁻
```

Name of X—OH	Formula of —X	Name of Phospholipid
Water	$-H$	Phosphatidic acid
Ethanolamine	$-CH_2CH_2NH_3^+$	Phosphatidylethanolamine
Choline	$-CH_2CH_2N(CH_3)_3^+$	Phosphatidylcholine (lecithin)
Serine	$-CH_2CH(NH_3^+)COO^-$	Phosphatidylserine
myo-Inositol	H; HO, OH; H, HO; OH, H; H, H; H, OH (ring structure)	Phosphatidylinositol
Glycerol	$-CH_2CH(OH)CH_2OH$	Phosphatidylglycerol
Phosphatidylglycerol	$-CH_2CH(OH)CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(-O-C(=O)-R_4)-CH_2-O-C(=O)-R_3$	Diphosphatidylglycerol (cardiolipin)

ال

محاليل اللازمة:

- أسيتون ثلجي
- مذيب الكلوروفورم والميثانول بنسبة ٢ : ١ (ح/ح)
- مذيب الكلوروفورم والميثانول بنسبة ١ : ١ (ح/ح)
- ايثر بترولي ٥٠ – ٧٠ درجة مئوية

طريقة العمل:

١- يضاف ١٥٠ مل من الأسيتون الثلجي إلى ٥٠ جرام مخ عجل في خلاط كهربي وتمزج سويا لمدة ٢ دقيقة.

٢- تنقل محتويات دورق الخلاط كميا إلى أنابيب الطرد المركزي مع غسيل دورق الخلاط مرتين بحوالي ٢٥ مل أسيتون في كل مرة ويضاف ناتج الغسيل إلى أنابيب الطرد المركزة السابقة.

٣- تجرى عملية الطرد المركزي للأنابيب على سرعة ٣٠٠٠ لفة/ دقيقة لمدة ١٠ دقائق ويستبعد الراشح والذي يمثل الجليسريدات الثلاثية والأستيرولات والصبغات التي تذوب بدورها في الأسيتون.

٤- يؤخذ الراسب (عبارة عن الفوسفوليبيدات التي تذوب في الأسيتون) ويغسل بإضافة كمية مناسبة من الأسيتون الثلجي إلى أنبوبة الطرد المركزي وتعاد الأنابيب إلى جهاز الطرد لمدة ٥ دقائق على سرعة ٣٠٠٠ لفة/دقيقة، يستبعد بعدها الراشح ويحتفظ بالراسب، ثم تعاد هذه الخطوة ثلاث مرات.

٥- ينقل الراسب الناتج إلى كأس زجاجي وتستخلص منه

الفوسفوليبيدات بوضع الكأس تحت جهاز المحرك الكهربي بعـــد إضافة ٥٠٠ مل مذيب الكلوروفورم والميثـــانول بنـــسبة ٢ : ١ (ح/ح) واستمرار التحريك لمد ٤ ساعات على درجـــة حـــرارة الغرفة ويترك بعدها المخلوط ساكنا ١٠ دقائق ليرسب.

٦- تؤخذ الطبقة الرائقة (التي تحتوى على الفوسفوليبيدات الذائبة في المذيب) حيث تجرى عملية تبخير للمذيب حتى الجفاف باستخدام حمام مائي كهربي.

٧- يعاد إذابة المادة الصلبة الناتجة عن عملية التبخير في ٢٥ مـــل ايثر بترولي ثم ترسب الفوسفوليبيدات بهـــا بإضـــافة ٢٠٠ مـــل أسيتون ثلجي ويتم تجميعها بواسطة الطرد المركزي.

٨- يذاب الراسب في أقل كمية من مذيب الكلوروفـــورم والميثـــانول بنسبة ١ : ١ (ح/ح) ويحتفظ به فى زجاجات محكمة الإغـــلاق وعلى درجة حرارة منخفضة (حيث أن تلك المركبات تتأكـــسد بسهولة فى الهواء الجوى) حتى إجراء الفصل الكروماتوجرافى.

ثانيا: فصل الفوسفوليبيدات باستخدام كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة

Separation of phospholipids by TLC

الأدوات المستخدمة:

- ألواح زجاجية مغطاة بطبقة من السليكاجل Silicagel G
- جار الفصل الكروماتوجرافى

- أنابيب شعرية

المحاليل اللازمة:

- المحاليل القياسية للفوسفوليبيدات: يذاب ٠,١ جرام من كل نوع من الفسفوليبيدات التالية على انفراد في ١٠ مل من الطور المتحرك وهى:

- Phosphatidylcholine (Lecithin)
- Phosphatidylethanolamine
- Phosphatidylinositol
- Phosphatidylserine
- Di phosphatidylglycerol (cardiolipin)
- Phosphatidylglycerol

- الطور المتحرك عبارة عن مذيب مكون من كلوروفورم : ميثانول : حامض الخليك : ماء مقطر بنسب حجميه ٢٥ : ١٥ : ٤ : ٢.
- محلول يود ١% مذاب فى الكلوروفورم (و/ح)
- مستخلص الفوسفوليبيدات

طريقة العمل:

١- تثبت ألواح السليكاجل على مكان مستوى وضع على أحد جوانبه علامات A-G على بعد ٢ سم من طرف اللوح وعلى أبعاد متساوية من بعضها، باستخدام أنابيب شعرية ضع نقط المحاليل بالترتيب التالي:

A- Phosphatidylethanolamine
B- Phosphatidylcholine (Lecithin)

C- Phosphatidylserine
D- Phosphatidylinositol
E- Phosphatidylglycerol
F- Di phosphatidylglycerol (cardiolipin)
G- Phopholipids extract مستخلص الفوسفوليبيدات للعينة

على خط البداية (ا) ثم يجفف مكان العينة في الهواء.

٢- يجرى الفصل الكروماتوجرافى باستخدام مذيب مكون من كلوروفورم : ميثانول : حامض الخليك : ماء مقطر بنسب حجميه ٢٥ : ١٥ : ٤ : ٢ ، وبعد انتهاء الفصل يرفع اللوح من المذيب وتحدد نهاية المذيب بالقلم الرصاص ثم يترك اللوح ليجف على درجة حرارة الغرفة.

٣- يتم رش الألواح بواسطة محلول يود ١% مذاب في الكلوروفورم (و/ح) حيث تمتص الفوسفوليبيدات اليود وتظهر على هيئة بقع بنية على اللوح الذي يتلون باللون الأصفر الغير ثابت.

٤- تقاس المسافة التي قطعها المذيب وكذلك المسافة التي قطعها كل نوع من أنواع الفوسفوليبيدات ويحسب معدل السريان R_f لكل منها واستغلال ذلك في التعرف على الفوسفوليبيدات المكونة للعينة.

ملحوظة هامة:

لزيادة كفاءة عملية الفصل السابقة لمستخلصات الفوسفوليبيدات فإنه يمكن إجراء الفصل الكروماتوجرافى في اتجاهين Two-dimensional TLC حيث تستخدم المذيبات التالية كطور متحرك :

- كلوروفورم : ميثانول : ماء بنسب حجميه ٦٥ : ٢٥ : ٤.
- داى أيزوبيوتايل كيتون : حامض خليك : ماء بنسب حجميه ٨ : ٥ : ١.
- داى أيزوبيوتايل كيتون : بيريدين : ماء بنسب حجميه ٢٥ : ٢٥ : ٤.
- كلوروفورم : ميثانول : هيدروكسيد أمونيوم ٢٨ % بنسب حجميه ١٣ : ٧ : ١.

حيث يتم استخدام أي من المذيبات السابقة في الفصل في الاتجاه الأول واستخدام أي مذيب آخر للفصل في الاتجاه الثاني العمودي عليه. ثم تقاس المسافة التي سارها المذيب الأول في الاتجاه الأول وكذلك المسافة التي سارها المذيب الثاني في الإتجاة الثاني وكذلك المسافة التي سارها كل نوع من أنواع الفوسفوليبيدات في كل اتجاه (تقاس هذه المسافة بعد تحديد أماكنها بعد انتهاء الفصل في الاتجاه الثاني) ويحسب معدل السريان R_f لكل منها مع كل مذيب.

الباب السادس

الفصل الكروماتوجرافى باستعمال الأعمدة
Column chromatography

الفصل الكروماتوجرافى باستعمال الأعمدة
Column chromatography

يعتبر الفصل الكروماتوجرافى على الأعمدة من أقدم أنواع الفصل الكروماتوجرافى والتى طبقت في أول الأمر على فصل الصبغات النباتية مثل الكلوروفيلات Chlorophylls والكاروتينات Carotenes وخلافة والتى انفصلت في صورة طبقات ملونة Colored bands على عمود الفصل. وتستعمل طريقة الفصل الكروماتوجرافى على الأعمدة الآن في العديد من التطبيقات البيولوجية الهامة مثل فصل البروتينات والأحماض الأمينية والنووية والملوثات الكيميائية وخلافة.

مميزات التحليل الكروماتوجرافى باستعمال الأعمدة:

يمتاز التحليل الكروماتوجرافى باستعمال الأعمدة عن طرق التحليل الكروماتوجرافى الأخرى فى نواحى عدة منها:

١- يفصل كميات كبيرة من المواد المراد فصلها (٠,٥ جرام فأكثر)

٢- يمنع الى حد كبير تأثر المواد الحساسة بالضوء Photosensitive أو التى تتعرض للأكسدة كما هو الحال أثناء الفصل باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة.

٣- يمكن من خلالة فصل المركبات الغير متطايرة بدرجة كافية أو التى تتحلل جزئيا عند درجات الحرارة اللازمة للتطاير، والتى كان يصعب فصلها باستخدام التحليل الكروماتوجرافى الغازى GLC.

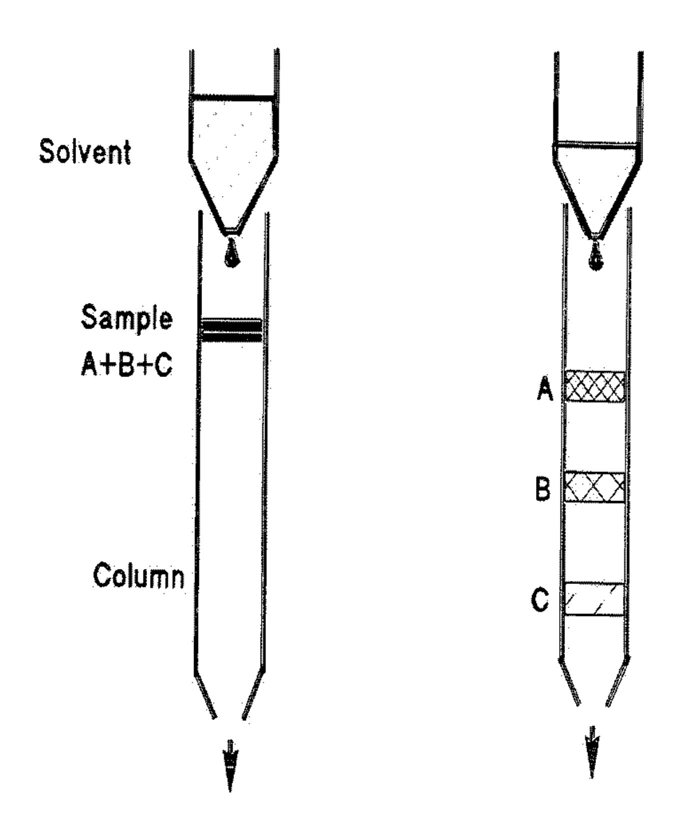
نظرية الفصل:

تبنى نظرية الفصل باستعمال الأعمدة على إدمصاص المركبات على سطح المواد الصلبة adsorbents بواسطة قوى قطبية أو قوى غير قطبية أو قوى جذب فاندرفالس، حيث تنفصل المركبات ذات القطبية المتوسطة أو المنخفضة بكفاءة عالية، بينما يكون الفصل بهذه التقنية غير مرضى نسبيا للمركبات عالية القطبية. ويعتمد الفصل فى هذه الطريقة بصفة عامة على عدة نقاط منها:

١- التداخل العكسى Reversible interaction الذي يتم ما بين مخلوط المواد المراد فصل مكوناتها Eluents والمادة الإدمصاصية الصلبة. وطبيعة التداخل قد يكون إدمصاص أو تبادل أيونى أو معامل التوزيع ما بين سائل وسائل Partition coefficient .

٢- درجة نشاط المادة الصلبة المسببة للإدمصاص: حيث تختلف قوة أسطح المواد الصلبة بالنسبة لإدمصاصها للمواد الكيماوية، ومن هذا المنطلق تقسم المواد الإدمصاصية الى ثلاث مجموعات هى:

- مواد ضعيفة الإدمصاص: ومنها السكروز والنشا والإينيولين وكربونات الصوديوم.



نظرية الفصل باستعمال عامود الكروماتوجرافى

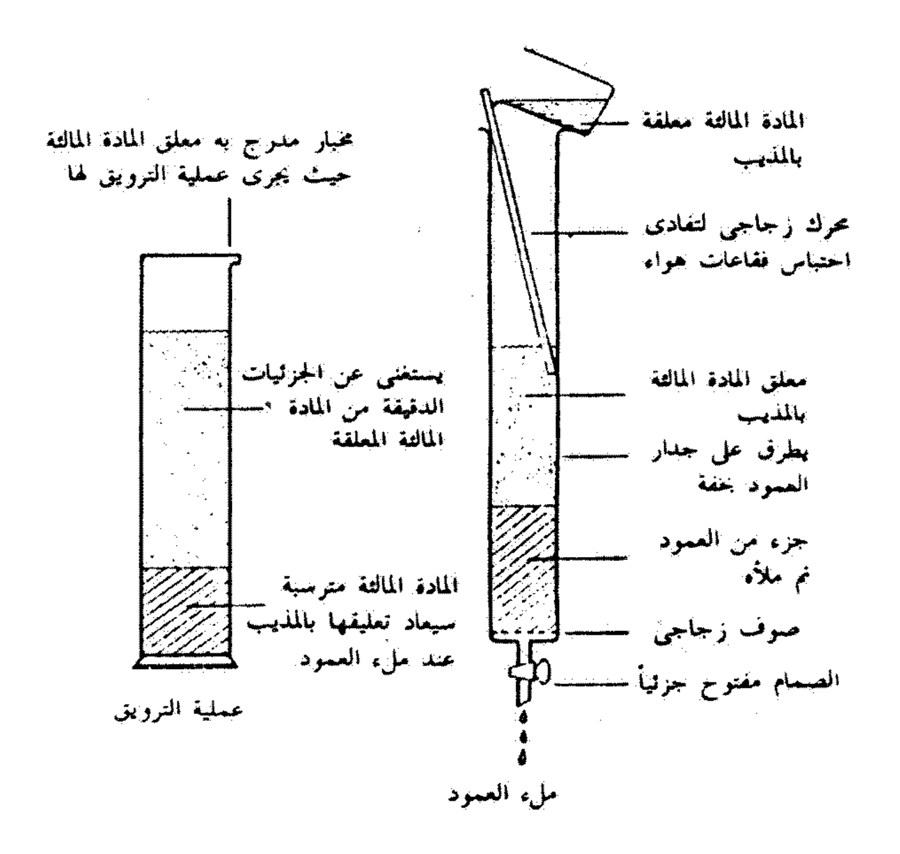
- مواد متوسطة الإدمصاص: مثل كربونات الكالسيوم وفوسفات الكالسيوم وأكسيد الماغنسيوم وأيدروكسيد الكالسيوم.
- مواد قوية الإدمصاص: ومنها سيلكات الماغنسيوم النشط وأكسيد الألومونيوم المنشط والفحم المنشط وأكسيد الماغنسيوم.

٣- عوامل أخرى مثل درجة قطبية المواد المراد فصلها Eluents ودرجة قطبية المذيب ودرجة الحرارة وشكل وأبعاد العمود.

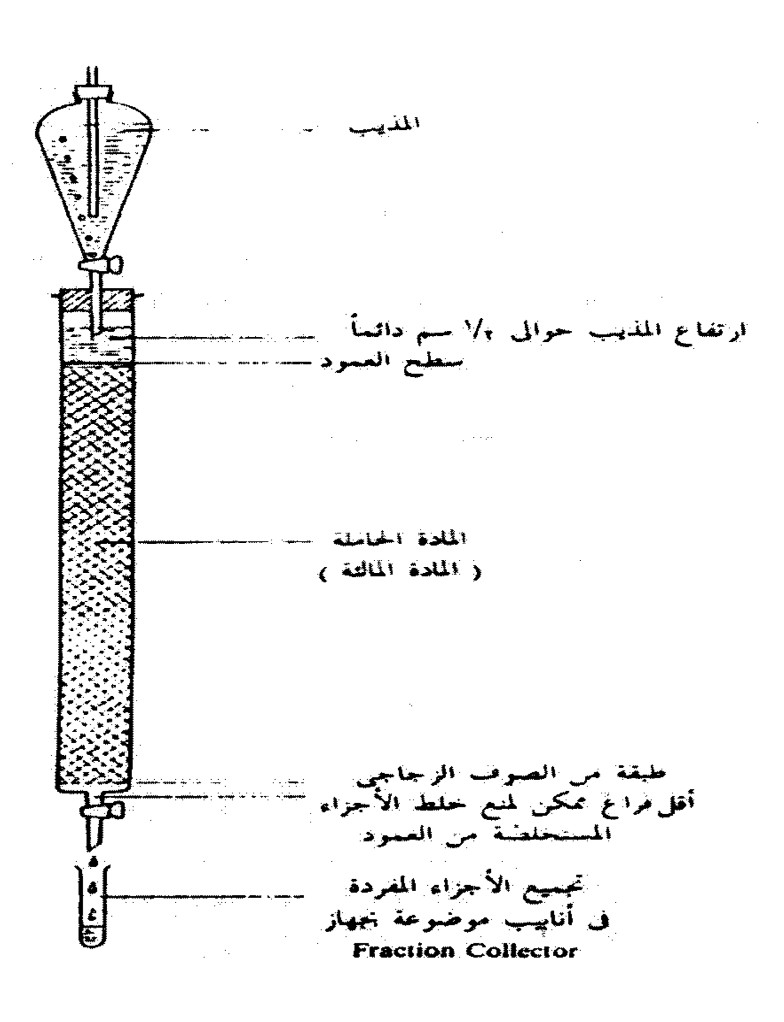
خطوات الفصل على أعمدة الكروماتوجرافى:

١ – إعداد الأعمدة للفصل Column preparation

تكون أعمدة الفصل الكروماتوجرافى عادة من الزجاج بأطوال وأقطار مختلفة وعموما فإن الأعمدة الطويلة ذات الأقطار الصغيرة تعطى فصلا جيدا إذا ما قورنت بالأعمدة القصيرة ذات الأقطار الكبيرة. كما تستخدم العديد من المواد المالئة التي سيتم الفصل عليها لملئ أعمدة الفصل الكروماتوجرافى مثل الألو مينا والسليكاجيل والسليولوز حيث تحتاج هذه المواد الى معاملتها بالمذيب المناسب قبل التعبئة حيث تنتفخ جزيئات تلك المواد بالمذيب وتظل مستقرة بقاع إناء الإذابة . يثبت العمود بعد وضعة على حامل في وضع رأسي ثم يوضع بأسفله طبقة من الصوف الزجاجي ثم يملأ لثلثه بالمذيب بعدها تسكب المادة المالئة المعدة من قبل على صورة معلق وذلك بمساعدة ماصة زجاجية أو محرك زجاجى لتفادى تكوين أى فقاعات هوائية



إعداد العامود للفصل الكروماتوجرافى



رسم توضيحي للعامود الكروماتوجرافى أثناء الفصل

بالعمود ثم يزال المذيب الزائد، يعقب ذلك إضافة دفعة جديدة من المادة المعلقة حتى يتم الوصول بالعمود الى الارتفاع المطلوب. يتم غسل العمود عدة مرات بالمذيب مع مراعاة ترك طبقة رقيقة من المذيب مقدارها ٠,٥ – ١ سم على السطح العلوي للعمود تفاديا لحدوث الجفاف.

ملحوظة هامة: لزيادة كفاءة الفصل على العمود يفضل إجراء عملية الترويق لأكثر من مرة حيث أن بقاء تلك الجزيئات الدقيقة ينتج عنه انسداد المسافات البينية بين الجزيئات المعبأة بداخل العمود مما يبطئ ويعيق عمليات الفصل.

٢ – إضافة العينات على العمود Application of sample

يتم إعداد العينة المراد فصلها بإذابتها في كمية صغيرة من المذيب ثم تضاف الى سطح العمود بواسطة ماصة زجاجية أو سرنجة ثم يفتح صمام العمود من أسفل حتى تهبط العينة الى الطبقة التي أسفل سطح العمود مباشرة، ويضاف بعدها المذيب الطور المتحرك Mobile (phase) عن طريق سحاحة أو قمع فصل بمعدل ١٠ – ١٥ نقطة / الدقيقة، ويراعى ضبط معدل السريان للمذيب حتى لا يسمح لسطح العمود بالجفاف.

٣– إزالة الطبقات المفصولة داخل العمود Elution

تزال المركبات التي تم فصلها داخل العمود على صورة طبقات Bands وذلك باستخدام المذيب المناسب لكل طبقة (قد تعبر الطبقة عن مركب واحد أو مجموعة من المركبات المتشابهة في الخواص) ويستخدم فى الفصل أغلب الأحيان خليط من المذيبات Mixture والتى

تسمح بإتاحة تدرج كبير في القطبية Polarity على طول العمود ممــا يساعد كثيرا في الفصل الجيد للمركبات وفقا للقاعدة المتعارف عليهــا في الفصل المتشابهات تذيب بعــضها الــبعض Like dissolve like ، ويطلق على هذا النظام من الفصل الذي يتم فيه تغير فى درجة قطبية المذيب كل فترة (على طول عمود الفصل) اســم الفــصل المتــدرج Gradient elution system فى حين يطلق على الفصل الذي يتم فيــه استخدام مذيب واحد طوال عمليــة الفــصل اســم الفــصل الموحــد Isocratic elution system .

خواص بعض المذيبات شائعة الاستخدام في الفصل الكروماتوجرافى

اسم المذيب	قوة المذيب ε°	اللزوجة (cP, ٢٥ °c)	امتصاص الأشعة UV (nm)	معامل الانكسار	نقطة الغليان (°C)
هكسان	٠,٠١	٠,٣٠	١٩٠	١,٣٧٢	٦٩
بنزين	٠,٣٢	٠,٦٥	٢٧٨	١,٥٠١	٨١
داى كلوروميثان	٠,٤٢	٠,٤١	٢٣٣	١,٤٢١	٤٠
١-بروبانول	٠,٨٢	١,٩٠	٢٤٠	١,٣٨٥	٩٧
تتراهيدروفيوران	٠,٨٢	٠,٤٦	٢١٢	١,٤٠٥	٦٦
ايثايل أسيتات	٠,٥٨	٠,٤٣	٢٥٦	١,٣٧٠	٧٧
كلوروفورم	٠,٤٠	٠,٥٣	٢٤٥	١,٤٤٣	٦١
داىأوكسان	٠,٥٦	١,٢	٢١٥	١,٤٢٠	١٠١
أسيتون	٠,٥٦	٠,٣	٣٣٠	١,٣٥٦	٥٦
إيثانول	٠,٨٨	١,٠٨	٢١٠	١,٣٥٩	٧٨
حامض الأسيتيك	كبيرة	١,١٠	---	١,٣٧٠	١١٨
أسيتونتريل	٠,٦٥	٠,٣٤	١٩٠	١,٣٤١	٨٢
ميثانول	٠,٩٥	٠,٥٤	٢٠٥	١,٣٢٦	٦٥
ماء	كبيرة جدا	٠,٨٩	---	١,٣٣٣	١٠٠

٤- الكشف عن المـــــواد المفصولة

Detection of eluants

يتم تجميع كل طبقة من الطبقات المفصولة في أنبوبـــة منفــصلة ليتم تحليلها بالطرق المناسبة للتعرف عليها أو لتحديد تركيزها، والتى عادة ما يستغل التحليل الطيفي لهذا الغرض كما هو الحال المتبع فـــي التعرف على الأمينات والأحماض الأمينية وخلافة.

ملحوظة هامة:

هناك كثير من المركبات قابلة للتحلـــل أو الأكـــسدة بواســـطة الضوء أو الهواء، لذلك أوجب الأمر حماية الأعمدة من الضوء بلفهـــا بورق أسود أو طلائها باللون الأسود أو العمل فى حيـــز مظلـــم مـــن المعمل. أما بالنسبة للمواد التى تتأكسد بسهولة فيجب تخلص المذيبات من الهواء بإمرار تيار من النتروجين خلالها أو إضافة مواد مـــضادة للأكسدة بتركيـــزات منخفـــضة مثـــل Butylated hydroxy toluene (BHT).

الفصل الكروماتوجرافى للأحماض الأمينية في السوائل البيولوجية على الأعمدة

Separation of amino acid in biological fluids by column chromatography

قد ينشأ العديد من الأمراض نتيجة حدوث خلل disorders أثناء عمليـــات التمثيـــل الحيـــوي للأحمـــاض الأمينيـــة Amino acid metabolism بداخل الجسم، مما يؤثر بدورة على نسب تواجد تلـــك المركبات بالسوائل البيولوجية المختلفة. لذلك تهدف هذه التجربة إلـــى فصل وتقدير نتروجين الأحمـــاض الأمينيـــة amino acid nitrogen في واحدا من السوائل البيولوجية الهامة بالجسم وهـــو البـــول Urine باستخدام طريقة الفصل الكروماتوجرافى على الأعمـــدة مـــن النـــوع كروماتوجرافى التبادل الأيونى Ion exchange chromatography

الأدوات المستخدمة:

- عمود زجاجي (سحاحة) ٥ ×١ سم.
- صوف زجاجي Glass wool
- خلاط كهربية Blender
- قمع فصل
- أنابيب اختبار

المحاليل اللازمة:

- المواد المالئة للعمود راتنج الـــديواكس (Dewex ٥٠x٨ ion exchange resin, H form, ٢٠٠-٤٠٠ mesh).

- محاليل لحامض الهيدروكلوريك ٢ ، ٠,٠١ عياري
- هيدروكسيد الصوديوم ٠,١ عياري
- دليل الفينوليفثالين ٠,٢٥ % في الكحول الإيثيلى.
- محلـــــول النفثوكينــــــون -٤- sodium β-naphthoquinone sulphonate ٠,٥% فى الماء المقطر، علـــى أن يحـــضر هـــذا المحلول طازجا فى خلال ١ ساعة قبل الاستخدام.
- محلول البوراكس (Sodium tetraborate) ٠,٢ %.
- كاشف الفورمالدهيد الحامضى: عبـــارة عـــن محلـــول حـــامض الهيدروكلوريك ٠,٣ عياري يحتوى اللتـــر منـــه علـــى ٣ مـــل فورمالدهيد ٤٠%.
- ثيوكبريتات الصوديوم ٠,٠٥ عياري.
- محلـــول الأحمـــاض الأمينيـــة الأساســـي Stock amino acid solution ٠,٢ ملليجرام/مل: يوزن ٥٣,٦ ملليجرام جليـــسين + ١٠٥ ملليجرام حامض الجلوتاميك وتـــذاب فـــي محلـــول ٠,٢% بنزوات الصوديوم المذابة في حامض الهيدروكلوريك ٠,٧ عياري ويوصل الحجم النهائي إلى ١٠٠ مل.
- محلول الأحماض الأمينية القياسي للاستخدام Standard amino acid solution for use : خفف ٣ مل من المحلـــول الأساســـي إلى ١٠٠ مل بواسطة محلول ٠,٢% بنزوات الصوديوم المذابـــة في حامض الهيدروكلوريك ٠,٧ عياري ، حيث يحتوى الملليلتـــر من هذا المحلول على ٦ ميكروجرام نتروجين حامض أميني.
- عينة البول الواقعة تحت الدراسة والتى يتم تجميعها علـــى مـــدار ٢٤ ساعة 24-hour urine specimen.

طريقة العمل:

١ – تحضير عمود الفصل Column preparation

تذاب المواد المالئة للعمود راتــنج الــديواكس (Dewex ٥٠x٨ ion exchange resin, H form, ٢٠٠-٤٠٠ mesh) فــي المــاء المقطر ، يثبت العمود الزجاجي في حامل رأسي ثم توضع طبقة مــن الصوف الزجاجة بأسفله ويملأ العمود بالمعلق ثم يغطى بطبقــة مــن الصوف الزجاجي.

٢ – فصل وإزالة الصبغات

Separation and elution of amino acid nitrogen

- يؤخذ ١٠ مل من عينة البول وتعدل درجة الحموضة لها pH ما بين ١-٢ باستخدام حامض الهيدروكلوريك ٠,٠١ عيــاري، ثــم تضاف إلى العمود، مع مراعاة الاحتفاظ ببعض الــسائل فــوق الصوف الزجاجي.
- يتم غسيل العمود مرتين الأولى باستخدام ٣ مــل مــن محلــول حامض الهيدروكلوريك ٠,٠١ عياري والثانية باســتخدام المــاء المقطر حتى تصل درجة الحموضة pH للــسائل المــزال مــن العمود elute إلى ٥ ، ويمكن الاستدلال علــى ذلــك باســتخدام ورق عباد الشمس.
- أضف ١ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم ٠,١ عياري إلى العمود وينتظر حتى يصل إلى أسفل العمود عندئذ يــضاف ١٠ مل أخرى من نفس المحلول والتى ينتج عنه تحول لون الــراتنج المكون للعمود من اللون الفاتح light إلى اللون البنــي الغــامق

(Sodium form الصورة الصوديومية للـــراتنج) dark brown

يجمع ١٠ مل من السائل المزال من العمود eluate بعد اســـتبعاد الـــ ٣ مل الأولى في كأس زجاجي ثم يمرر فيهـــا الهـــواء ٣٠ دقيقة بهدف إزالة الأمونيا.

- ينقل ١ مل من المحلول إلى دورق معياري ســـعة ٥٠ مـــل ثـــم يـــضاف ٣٥ مـــل مـــاء مقطـــر ويعـــاير المحلـــول بحـــامض الأيدروكلوريك ٢ عياري حتى يزال اللون القرنفلي pink لـــدليل الفينوليفثالين ثم يعاد اللون مرة أخرى بإضافة محلـــول الـــصودا الكاوية ٠,١ عيارى، ويكمل المحلـــول بالمـــاء المقطـــر حتـــى العلامة.

٣- تقدير النتروجين الأميني Amino acid determination

- ترقم ثلاثة أنابيب اختبار (١×٦ بوصة) للعينة والمحلول القياســـي وتجربة البلانك على النحو التالي:

رقم الأنبوبة	المكونات
١ (العينة)	٥ مل مستخلص + ١مل محلول بوراكس + ١مـــل محلول النفثوكينون
٢ (المحلول القياسي)	٥ مل محلول قياسي + ١مل محلـــول بـــوراكس + ١مل محلول النفثوكينون
٣ (الكنترول)	٥ مل ماء مقطر + ١مل محلول بوراكس + ١مـــل محلول النفثوكينون

- تخلط محتويات الأنابيب جيدا ثم توضع على حمام مـــائي يغلـــى لمدة ١٠ دقائق ثم تزال بعدها وتوضع فى مـــاء بـــارد لمـــدة ٥ دقائق.

- تخفف محتويا الأنابيب بالماء المقطر حتـــى يـــصل الحجـــم النهائي إلى ١٣ مل ثم يضاف ١ مل من كاشف الفورمالدهيد + ١ مل من محلول ثيوكبريتات الـــصوديوم ٠,٠٥ عيـــاري (بهدف تحميض الوسط وإزالـــة اللـــون للزائـــد مـــن مـــادة النفثوكينون)، ويضبط الحجم النهائي للأنابيب بالماء المقطـــر إلى ٢٥ مل وتخلط جيدا ثم تترك الأنابيب ســـاكنة لمـــدة ٣٠ دقيقة.

- يقرأ الامتصاص الضوئي للأنابيب عند طول موجي ٤٧٠ – ٤٨٠ نانوميتر ثم تحسب كمية نتروجين الأحماض الأمينيـــة على النحو التالي:

$$\text{تركيز نتروجين الأحماض الأمينية فى العينة (ملليجرام/ عينة ٢٤ ساعة)} = \frac{\text{الامتصاص الضوئي للعينة}}{\text{الامتصاص الضوئي للمحلول القياسي}} \times ٠,٠٣٠ \times \frac{\text{حجم العينة}}{٠,١}$$

الباب السابع

الفصل الكهربي

Electrophoresis

الفصل الكهربي
Electrophoresis

نظرية الفصل:

تحمل الكثير من جزيئـــات المركبـــات البيولوجيـــة شـــحنة أو شحنات كهربية electrical charge ، حيث تعتمد نوعية هذه الشحنات على نوع الجزيئات ودرجة حموضة أو قاعدية المحلول (رقم ال pH) ومكونات المحلول المذيب. وعند إمرار التيار الكهربي في المحلـــول المذيب تتحرك هذه الجزيئات المشحونة في المحلول باتجاه الأقطاب electrodesالتي تحمل شحنة معاكسة لشحنتها. ولقد اســـتخدمت هـــذه النظرية في الفصل الكهربي electrophoresis لفصل الجزيئـــات ذات الشحنات الكهربية المختلفة.

تطور الفصل الكهربي:

يعد العالم السويدي تزيليوس Tiselius أو مـــن اكتـــشف هجـــرة البروتينات تحت تأثير المجال الكهربي فى الوسط السائل عـــام ١٩٣٨ م ، حيث استخدم لها الغرض أنبوبة زجاجية على شـــكل حـــرف U تحتوى على محلول منظم لفصل البروتينات خلاله عند مرور التيـــار الكهربي في المحلول بالأنبوبة، ثم أجرى بع ذلك كشفا على المحلـــول بفرعي الأنبوبة وذلك بقياس معامـــل انكـــسار المحلـــول Refractive index . وبالرغم من أهمية هذا الاكتشاف فى التعرف علـــى تـــأثير الخواص الطبيعية للمحلول على تغير سريان البروتين به، إلا أنه لـــم يتمكن من فصل البروتينيات عن بعضها فصلا كـــاملا حيـــث أثـــرت الجاذبية الأرضية على انتقال مناطق البروتينات المفصولة بـــالمحلول

وجعلتها تختلط مع بعضها البعض.

ولقد تم التغلب على هذه المشكلة باستخدام طريقة أخرى أمكـــن بها تحديد المناطق بواسطة الفصل على الألكترفوريسيس، حيــث تــم فيها وضع خليط من المواد المراد فصلها على هيئة نقطة على مسافة معينة من كلا القطبين الموضوعين، مما جعــل الأجــزاء البروتينيــة المختلفة والتى تتحرك بسرعات مختلفة تبتعد عن بعــضها الــبعض وأمكن فصلها في اتجاه حركتها.وبالرغم من ذلك فقــد بقيــت هنــاك مشكلة كبيرة تمثلت في محاولــة تثبيــت هــذه الأجــزاء البروتينيــة المفصولة في الأماكن التي تحركت إليها حيث أنه كان مــن المحتمــل أن يعاد انتشار هذه الجزيئات تلقائيا مرة أخرى داخل هــذا المحلــول مما تعذر معه استخدام هذه الطريقة بداخل المحلول الحر.

وللتغلب على ذلك بدأ التفكير في استخدام أوساط ثابتــه لتكــون بديلا عن هــذا الوســط الحــر بحيــث يجــرى الفــصل الكهربــي (الألكترفوريسيس) على مادة حاملة للمحلول المنظم الذي سيجرى بــه الفصل مثل الورق والجيل. فعند استخدام الورق كوسط فــي الفــصل الكهربي فإن عملية التثبيت تتم بواسطة تجفيف الورق بــسرعة فــي الفرن عند نهاية عملية الفصل. أما عند استخدام الجيل فإنــه يوضــع بسرعة في أحواض خاصة تحتوى على محاليل مثبتــة بعــد عمليــة الفصل الكهربي والتى تعمل على ترسيب الأجزاء البروتينية المختلفــة المفصولة بعد أن تكون قد تحركت في الاتجاه الصحيح ، وبهذا يمكــن تحديد تلك المناطق والتى تكون على شكل خطوط أو دوائر Zones or bands وذلك على حسب الطريقة التي تم بها وضــع العينــة المــراد فصلها فى بداية التجربة.

جهاز الفصل الكهربي Electrophoresis apparatus

يتكون جهاز الفصل الكهربي بصفة عامة مــن الأجــزاء الأساســية التالية:

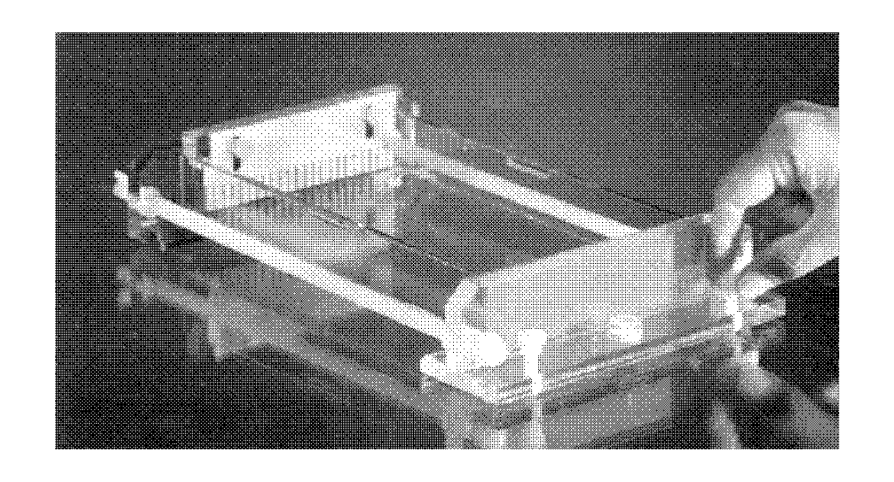
١ – وحدة الألكترفوريسيس

عبارة عن وعاء من البلاستيك به حاجز في منتصفة يقسمه إلــى جزئين معزولين حيث يتصل الكترود من البلاتين بكل جــزء ليكــون إحداهما سالب والأخر سالب. وتغطى هذه الوحدة أثناء الفصل بغطــاء شفاف وعازل يتم من خلاله المتابعة أثنــاء عمليــة الفــصل. ويجــد نظامان لهذه الوحدات:

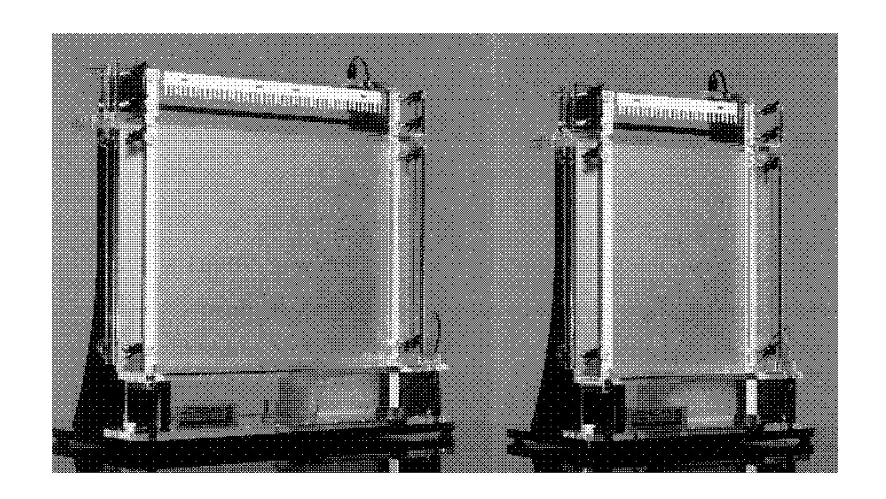
- **النظام الأفقي**.. وفيه يكون نــصفى الوعــاء المحتويــان علــى المحلول المنظم بجانب بعضهما البعض فى وضع أفقي كما هــو الحال فى جهاز الفصل الكهربي باستخدام أســيتات الــسليولوز والأجاروز-جل.
- **النظام الرأسي**.. ويلاحظ به نصفى الوعــاء المحتويــان علــى المحلول المنظم يكون أحدهما فوق الآخر، حيث إن الجل يكــون بينهما في وضع رأسي كما هو الحال في جهاز الفصل الكهربــي باستخدام البولى أكريلاميد.

٢ – وحدة توليد القوه الكهربية Power park

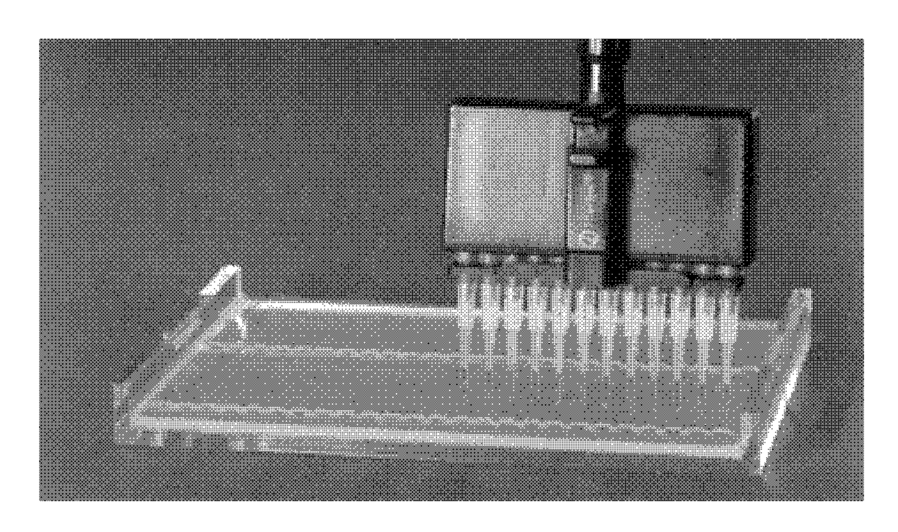
عبارة عن منظم للتيار الكهربي يتضمن وجود تيــار كهربــي مستمر DC وثابت الشدة وعملية مراقبة أو توجيه لسعة التيار والجهد



نظام الجيل الأفقي (Horizontal gel system)



نظام الجيل الرأسي (Vertical gel system)



تحميل العينات بواسطة الماصات متعددة القنوات

Samples loading in combs with a multichannel pipettor



وحدة توليد القوة الكهربية

Power park

المستخدمان في الفصل الكهربي. وتقسم الأجهزة المستخدمة في عملية الألكترفوريسيس تبعا للجهد الكهربي المستخدم إلى:

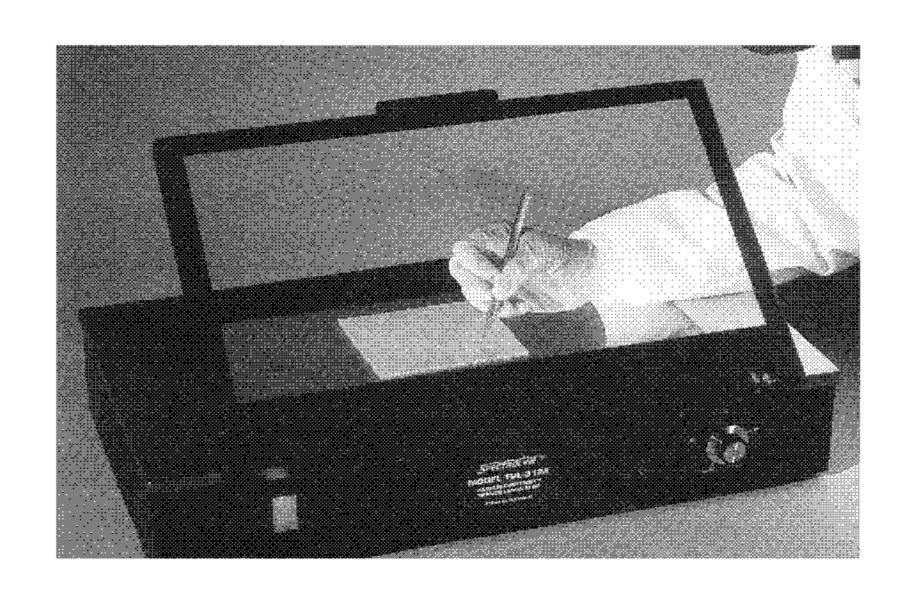
- **أجهزة التشغيل بالجهد المنخفض:** وتستخدم عـــادة عنـــد إجـــراء الفصل الكهربي للمركبات ذات الوزن الجزيئى الكبير وفيهـــا تكـــون مجموعة توليد القوة فعالة باستخدام جهد يتراوح بين صفر إلـــى ٥٠٠ فولت وتيار تتراوح شدته بين صفر إلى ١٥٠ أمبير

- **أجهزة التشغيل بالجهد العالي:** وتـــستخدم عنـــد إجـــراء الفـــصل الكهربي للمركبات ذات الوزن الجزيئى الصغير والتى يصعب فصلها بالنظام السابق وفيها تكون مجموعة توليد القوة فعالة باســـتخدام جهـــد عالي يصل إلي حوالي ١٠٠٠٠ فولت وشدة تيار مقدارها ٥٠٠ ملـــي أمبير مما يتيح معدلا أكبر للانتشار ووضوح وسرعة الفـــصل حيـــث تتراوح مدة التشغيل ما بين ١٠ – ٦٠ دقيقة.ونظرا لأن الجهد العـــالي المستخدم فى هذه الوحدات يولد حرارة مرتفعة مما يتطلب معه وجود أنظمة تبريد مباشرة للوسط الداعم والتى يتم إما عن طريـــق الغمـــر الكلى لأجزاء وحدة الألكترفوريسيس فى سائل عـــضوي يقـــوم بهـــذا الغرض مثل التـــولين Toluene أو الفارســـول Varsol أو باســـتخدام أطباق التبريد (أطباق من الألومونيوم تحيط بالوسط الـــداعم و يمـــر خلالها الماء البارد الذي يتم ضخة من مضخة خارجيـــة معـــدة لهـــذا الغرض).

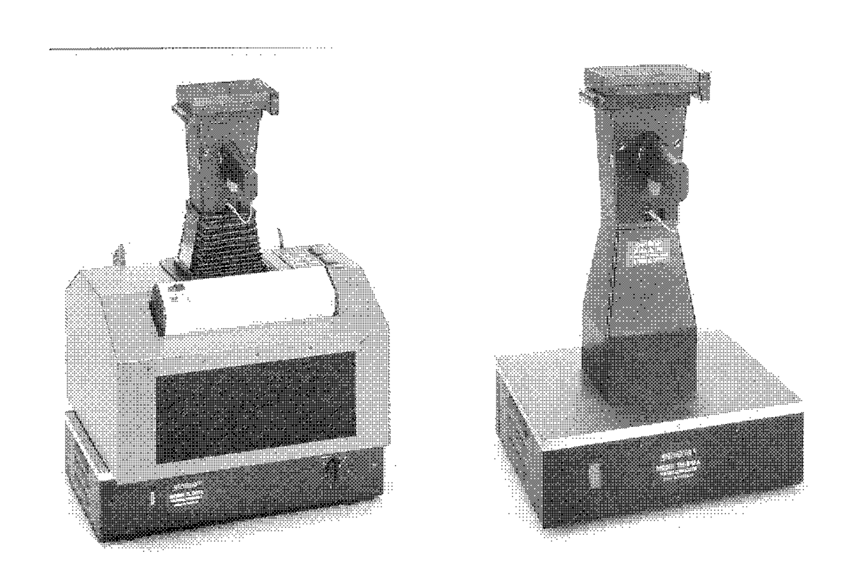
٣- وحدات مكملة

نظرا لأنه في أغلب الأحيان لا يمكن مشاهدة ورؤية الخطـــوط

أو الدوائر Zones or bands المكونة للجزيئات المفصولة بعد عملية الفصل الكهربة بالعين المجردة فإن ذلك يستدعى توافر **وحدة الإضاءة** Illuminator والتى تحتوى على مصدر للإضاءة المرئية UV وكذلك مصدر آخر للإضاءة الفوق بنفسجية UV لإتمام هذا الغرض. وعقب مشاهدة الخطوط أو الدوائر Zones or bands المكونة للجزيئات المفصولة يتم التقاط صورة فوتوغرافية لها عن طريق **وحدة التصوير** المعدة لهذا الغرض والتى تركب فى الحال فوق وحدة الإضاءة وتتكون من كاميرا بولارويد فورية مزودة بهود (كابينة مستطيلة أو مربعة) تحيط بالجل المراد تصويره من جميع الجوانب. ولقد تم حديثا إلحاق أجهزة الفصل الكهربي **بوحدات التخطيط الفوتومترى Scanner** والمتصلة بالحاسب الآلي المزود ببعض البرامج المتخصصة لهذا النظام من التحليل مثل Gel Pro III والتى يتم من خلالها إجراء كافة الحسابات لتقدير الخطوط أو الدوائر Zones or bands المكونة للجزيئات المفصولة كميا (نسبة وجودها بالنسبة لبعضها البعض) وحساب أوزانها الجزيئية ورسم منحنى أو مخطط على حسب درجة تركيز الألوان إليكترونيا الخ.



إحداث التخطيط الفوتوميترى (Scanner)



وحدة التصوير Polaroid Camera with Hood)

<u>العوامل التى تؤثر على كفاءة الفصل باستخدام أجهزة الفصل الكهربى</u>

أولا: طبيعة الجزيئات المشحونة الممثلة للعينة المراد فصلها

- **مقدار الشحنة على الجزيئات** .. يزداد معدل هجرة الجزيئات المكونة للعينة فى المجال الكهربى أو بمعنى آخر سرعة الجذب نحو القطب الكهربى المعاكس لها فى الشحنة بزيادة مقدار الشحنة عليها ، والذي يعتمد بدرجة كبيرة على درجة الحموضة للوسط، وذلك حسب قانون الجذب الكهربي والذي ينص على أن شدة الجذب تتناسب مع مربع الشحنة.
- **حجم الجزيئات** .. ينخفض معدل الانتشار في حالة الجزيئات الكبيرة مقارنة بالجزيئات الصغيرة نظرا لزيادة الاحتكاك والقوة الكهربية الساكنة التي يبذلها الوسط الداعم المحيط.
- **شكل الجزيئات** .. لوحظ أن اختلاف شكل الجزيئات ذات الأحجام المتساوية يؤدى إلى حدوث اختلافا واضحا في معدل الانتشار ومرجع ذلك إلى الاختلاف في تأثير قوة الاحتكاك والقوة الكهربية الساكنة التي يبذلها الوسط الداعم المحيط.

<u>ثانيا: المحاليل المنظمة</u>

يجب مراعاة عدة نقاط عند اختيار المحلول المنظم الذي سيستخدم في الفصل الكهربي والتى من أهمها:

- **تركيب المحلول المنظم..** يراعى ألا تتفاعل مكونات المحلول المنظم مع مكونات المادة المراد فصلها كما هو الحال بالنسبة

لأيونات البورات Borate التى تكون مركبا معقدا مع السكريات، وبالتالى فلا يمكن استخدام محلول منظم من البورات اذا ما أريد فصل السكريات كهربيا. ومن أبرز المحاليـل المنظمـة التـى تستخدم فى الألكترفوريسيس الفورمـات Furmate والخـلات Acetate والسترات Citrate والباربيتون Barbitone والفوسفات Phosphate والترس Tris والبيريدين Pyridine.

- **درجة الحموضة للمحلـول المـنظم..** يعتمـد اختيـار الـرقم الأيدروجينى pH للمحلول المنظم على مكونات المـادة المـراد فصلها، ولكن بصفة عامة فإن أفضل فصل يمكن الحصول عليه عندما يكون الرقم الأيدروجينى قريبا من نقطة التعادل الكهربـي لأحد مكونات المادة المراد فصل مكوناتها. كما يجب ألا يحـدث تغير فى التركيب الكيميائي أو الطبيعي للمـادة المـراد فـصل مكوناتها عند الرقم الأيدروجينى الـذي تـم اختيـاره للمحلـول المنظم. وفى هذا السياق نذكر أن درجة تأين الأحماض العضوية تزداد بزيادة رجة الحموضة مما يكون له تأثير واضـح علـى الهجرة فى المجال الكهربة. أما بالنسبة لبعض المركبات التى لها خـواص حامـضية وقاعديـة (أمفوتيريـة Amphotyric) كالأحماض الأمينية مثلا فإن التوجيه الفعلي لهـا يعتمـد علـى درجة الحموضة للمحاليل المنظمة، ولعل هذه الخاصـية تـسمح باستخدام مجال واسع من درجات الحموضة (pH) فى الفـصل يتراوح بين ١ – ١١ لإتمام الفصل المطلوب.

- **تركيز المحلول المنظم..** يفضل أن يكون تركيز المحلول المنظم ما بين ٠,٠٥ – ٠,١٥ مولر، حيث أن عنـد اسـتخدام محلـول

منظم مرتفع التركيز (ذو قوة تأين عالية) فإن مقدار شدة التيـــار المحمول بواسطة المحلول المنظم سوف تزداد بينما تقـــل كميـــة التيار المحمولة بواسطة العينة، مما يؤدى إلى حدوث نقص فـــى معدل الهجرة للجزيئات. هذا إضافة الى ما تحدثة قـــوة التـــأين العالية للمحلول المنظم من زيادة فى شدة التيار مسببة ارتفاع فى درجة الحرارة. كما يحدث عكس ذلك في حالة استخدام محلـــول منظم منخفض التركيز (ذو قوة تأين منخفضة).

ثالثا: المجال الكهربى

يتأثر فصل الأيونات فى المجال الكهربي بالعناصر الثلاثـــة المكونة للمجال الكهربي وهى شدة التيار بـــالأمبير (A) وفـــرق الجهد بالفولت (V) والمقاومة بـــالأوم (R) ، والتـــى يحكمهـــا جميعا قانون أوم:

$$A = V/R$$

فعند توصيل التيار الكهربي بين قطبـــي الجهـــاز داخليـــا بواسطة المحلول المنظم وأيونات العينة فإن معدل الهجـــرة فـــي المجال الكهربي يتناسب طرديا مع شدة التيار. لذلك فـــإن ذلـــك يستلزم استخدام تيار مستمر DC والمحافظة على قيمـــة ثابتـــة للتيار . كذلك لوحظ أن معدل الهجـــرة فـــى المجـــال الكهربـــي يتناسب عكسيا مع المقاومة والتى تعتمد أساسا على نوعية وحجم الوسط الداعم وقوة التأين للمحلـــول المـــنظم. ويراعـــى تـــأثر العناصر الثلاثة المكونة للمجال الكهربي بدرجة الحرارة، حيث لوحظ أن زيادة درجة الحرارة أثنـــاء إجـــراء عمليـــة الفـــصل الكهربي يتسبب فى حدوث نقصان فى مقدار المقاومة وفى ثبات

الجهد وزيادة فى شدة التيار، والتى تتسبب في حدوث زيادة في تبخر المذيب من على الوسط الداعم ، وما يستتبع ذلك من حدوث جفاف لهذا الوسط، وبالتالي خلل في الفصل.

رابعا: الوسط الداعم

ويقصد به الوسط الذي يتم عليه فصل العينة، ولتركيب هذا الوسط عدة تأثيرات على معدل هجرة الجزيئات في المجال الكهربي تتمثل فى:

- **الإدمصاص..** قد يحدث ادمصاص لجزيئات العينة بواسطة الوسط الداعم كما هو الحال عند استخدام الورق لهذا الغرض، مما يؤدى الى تقليل معدل هجرة الجزيئات فى المجال الكهربي.
- **درجة الحرارة..** تؤثر درجة الحرارة على مقاومة الوسط الداعم وما يستتبعه ذلك من حدوث تغير فى شدة التيار سوف تؤثر على سرعة هجرة الجزيئات فى المجال الكهربي. ويحدث ذلك بوضوح فى حالة ارتفاع درجة الحرارة عن ٥٥ درجة مئوية والتى تؤدى الى حدوث تغير فى الخواص الطبيعية للعينة مثل تخثر البروتين Denaturation مما يفقدة بعض خواصة الطبيعية، أو قد يتسبب ذلك فى ترسب البروتين على الوسط الداعم ويلتصق عليه، ومن ثم تتغير سرعة الهجرة في المجال الكهربى. هذا إضافة إلى ما قد تحدثه درجة الحرارة من تأثير مباشر على درجة تأين بعض المواد فى الوسط، وما يستتبعه ذلك من من تغيير فى درجة الحموضة (pH) للمحلول المنظم، وبالتالي تأثر سرعة جزيئات العينة على الوسط الداعم.

- **القوة الكهربية الداخلة ..** تحدث هذه الظـــاهرة عنـــد اســـتخدام مادتين مختلفتين كيميائيا مثل الماء (كأحـــد مكونـــات المحلـــول المنظم) والورق (كوسط داعم)، حيث يؤدى ذلك إلى حدوث تأين نسبى لهما تحت تأثير المجال الكهربي، خاصة بالنـــسبة للمـــاء، حيث أن الورق ثابت والماء سهل الحركة. ونتيجة لـــذلك تتجـــه جزيئات الماء ناحية المهبط حاملـــة معهـــا الأيونـــات الموجبـــة للمحلول المنظم وهو اتجاه معاكس لحركة الجزيئـــات المهـــاجرة في اتجاه المصعد، حيث يطلق على الحركة العكـــسية لأيونـــات المحلول المنظم بالقوة الكهربية الداخلة أو الأسموزية الداخلة.

<u>المواد المستخدمة كوسط داعم Supporting media</u>

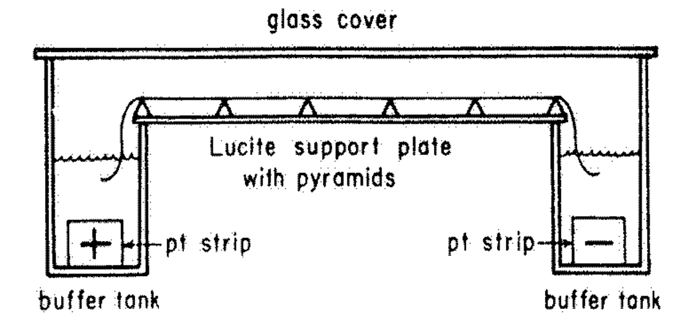
١- **ورق الترشيح Filter paper ..** يعتبر الورق من أوائـــل المـــواد التي استخدمت فى الفصل الكهربي (الألكترفوريـــسيس) حيـــث يطلق على النظام فـــى هـــذه الحالـــة Paper electrophoresis . ويتميز الورق برخص ثمنه مقارنة بالمواد الأخرى المـــستخدمة الآن، إلا أن الفصل الكهربي باستخدام الورق ينتابه العديد مـــن العيون منها حدوث خلط بين مناطق المـــواد المفـــصولة عليهـــا نتيجة حدوث ادمصاص لجزيئاتها على السيليلوز، كذلك يحتـــاج الى فرق جهد مرتفع. كما أنها طريقة بطيئة وتحتاج كمية مـــن المادة المراد فصلها أكبر مما تحتاجه الطرق الأخرى.

٢- **خلات السليولوز Cellulose acetate ..** تحضر خلات السليولوز الخام من معاملة السليولوز باندريـــد حـــامض الخليـــك Acetic anhydride ثم تشكل العجينة الناتجة الى رقـــائق رفيعـــة جـــدا.

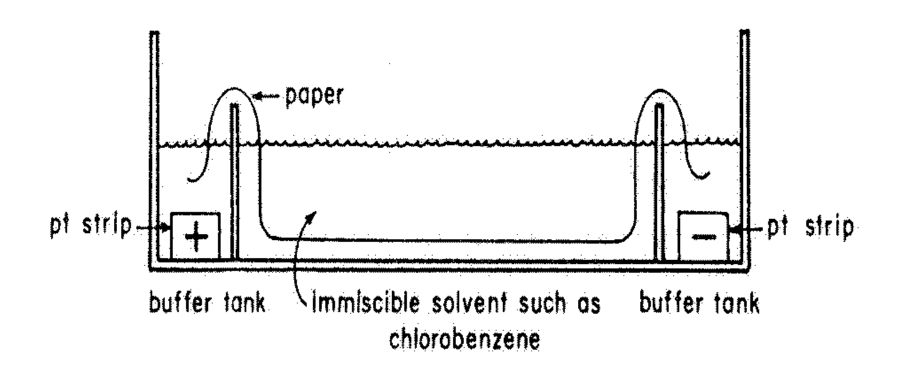
وتستخدم رقائق خلات السليولوز بكثرة فـــى عمليـــات الفـــصل الكهربى لما لها من ممزات عدة منها:

- تحتاج الى كمية صغيرة جدا من العينة تقدر بحـــوالى ١ – ١٠ ميكروميتر.
- قصر الوقت اللآزم لإتمام عملية الفصل والذى يتراوح بين ٢٥ – ٤٠ دقيقة.
- يمكن بعد اجراء عملية الصباغة جعل الشريحة شفافة ممـــا يساعد على استخدام جهاز تقدير الجزيئات المفصولة كميـــا Scanner وعمل رسم مخطط أو منحنى على حسب درجة تركيز اللون اتوماتيكيا.

٣- **الأجار –جل Agarose-gel ..** يستخدم الأجاروز– جـــل حـــديثا على نطاق واسع فى عمليات الفصل بالألكترفوريسيس حيث أنه يحضر من الأجار Agar والذى يتكون من مكونين علـــى الأقـــل همـــا الأجـــاروبكتين Agaropectin والأجـــاروز Agarose . ويحتوى الأجاروبكتين علـــى مجموعـــات قابلـــة للتـــأين مثـــل الكبريتات والكربوكسيل بينما لا يحتـــوى الأجـــاروز علـــى أى مجموعات قابلة للتأين لذلك فهو متعادل كهربيا Non-ionic



الفصل بالإلكتروفوريسيس على الورق بالطريقة الأفقية



الفصل بالإلكتروفوريسيس على الورق بطريقة الغمر

component of agar . يحضر الأجارللفصل الألكترفوريسيس بتركيز ١% فى المحلول المنظم وذلك بالتسخين على حمام مائى عند درجة حرارة ٩٥ درجة مئوية لمدة ١٠ دقائق أو باستخدام فرن الميكرويف لمدة ثواني. وفى كل الأحوال يفضل عدم الغليان حتى لا تتبخر كمية المحلول المنظم ويتغير التركيز. ويتميز الفصل فى المجال الكهربى بالعديد من المميزات الهامة جعلت منه أكثر الأوساط الداعمة انتشارا منها:

- صغر حجم العينة التى تستخدم لغرض الفصل.
- طبقة الأجاروز-جل عديمة اللون وشفافة مما يسهل من ملاحظة ومتابعة مكونات العينة بسهولة ، وكذلك اذا ما أريد اجراء تخطيط Scanning لرسم منحنى يوضح أماكن الجزيئات المفصولة ونسبتها لبعضها البعض.
- يمكن تجفيف طبقة الأجار وبذا يمكن الإحتفاظ بنموذج الفصل والرجوع إليه عند الضرورة.
- تستغرق عملية الفصل على طبقة الأجار وقتا أقصر ، حوالي ٩٠ دقيقة فقط، اذا ما قورنت بالفصل على الورق والذي يستغرق ١٤-٢٠ ساعة فى المعتاد.

٤- **بولى أكريلاميد-جل Polyacrylamide gel** .. يعد استخدم البولى أكريلاميد-جل فى الفصل الكهربي من أكثر الطرق استخداما وأكثرها دقة لمميزات عدة منها:

- طبقة البولى أكريلاميد-جل عديمة اللون وشفافة مما يسهل من ملاحظة ومتابعة مكونات العينة بسهولة ، وكذلك توضيح

الجزيئات المفصولة ونسبة وجودها بالنسبة لبعضها البعض وذلك باستخدام التخطيط الفوتومترى Scanning بالـضوء العـادي أو بالأشعة الفوق بنفسيجية.

- يمكن تحضير البولى أكريلاميد-جل بتركيزات مختلفة تتراوح ما بين ٢-١٠ % وزن/حجم، حيث تزيد المافة بين جزيئات الجـل كلما قل تركيزه وتقل المسفة كلما زاد التركيز، مما يسمح باستخدام التركيز المناسب من البولى أكريلاميد-جل تبعا لنـوع المادة المراد فصل مكوناتها.

الفصل الكهربي لبر وتينات البلازما على رقائق من الأجاروز جل

Electrophoresis separation of plasma protein on agarose gel films

نظرية العمل:

تتحمل جزيئات البروتينات طبيعيا بشحنات كهربيـــة تختلــف نوعيتها وكميتها عند رقم هيدروجيني محدد تبعا لنوعيـــة البـــروتين، فعند مرور التيار الكهربي فى محاليل تلك الجزيئات فإنها تتجه باتجاه الأقطاب المعاكسة لها فى الشحنة، ويمكن إظهـــار أمـــاكن الجزيئـــات البروتينية المفصولة على الجل بصبغها ثم تقدير كميتها طيفيا.

الأدوات المستخدمة:

- جهاز الكتروفوريسيس (وحدات الصب – منظم التيار الكهربي) مع كافة مشتملاته.
- أنابيب شعرية من النوع المعامل بالهيبارين Heparinized capillary tubes
- أبر خاصة معقمة Lancets
- جهاز طرد مركزي Centrifuge
- أحواض صبغ
- جهاز سبكتروفوتوميتر Spectrophotometer
- عينات البلازما

المحاليل اللازمة:

- **المحلول المنظم:** يوزن ١,٨٣ جرام مـــن حـــامض الباربيتـــال

Barbituric acid في كأس زجاجي نظيف ثم يضاف الى الكـــأس كمية من الماء المقطر مع التقليب المستمر حتى تمـــام الـــذوبان (فى حالة عدم الذوبان الكامل يمكن وضع الكأس المحتوى علـــى الحامض فى حمام مائي درجة حرارته ٤٠ – ٥٠ درجة مئوية)، ثم يضاف إلـــى الكـــأس ١٠,٣ جـــرام مـــن مـــادة داى إيثيـــل باربيتورات الصوديوم Sodium diethyl barbiturate بالتـــدريج مع التقليب. تنقل محتويات الكأس كميا إلى دورق معياري ١ لتر ثم يكمل الى العلامة بالماء المقطر. يضبط الرقم الأيـــدروجينى للمحلول الى ٨,٦ (pH = ٨,٦) باستخدام أحد المحاليل التالية:

- **محلول حامض الهيدروكلوريك** ٠,١ عيـــاري (HCl ٠,١ N): يحضر بإضافة ٥٠ مل من الماء المقطر إلـــى دورق معيـــارى سعة ١٠٠ مل ثم يضاف بحذر على جدار الدورق ٨,٦ مل مـــن حامض الهيدروكلوريك المركز مع التقليب ثم يكمل الدورق إلى العلامة بالماء المقطر.

- **محلول هيدروكسيد الصوديوم** ٠,١ عيـــارى (NaOH ٠,١ N): يحضر بإذابة ٤ جرام من بللورات هيدروكسيد الـــصوديوم فـــى ١٠٠ مل من الماء المقطر.

- **محلول الغسيل:** يمكن استخدام أحد المحاليل التالية:

محلول حامض الخليك ٢ % : يحضر بخلط ٢٠ مل من حامض الخليك المركز مع ٩٨٠ مل من الماء المقطر.

محلول حامض الخليك وكحول الإيثانول: يحضر بخلط حـــامض الخليك وكحول الإيثانول والماء المقطر بنسب ٢ : ٩ : ٩ علـــى

الترتيب.

- **محلول الصبغة:** يمكن استخدام أحد المحاليل التالية:
محلول صبغة أسود الأميد Amido black B أو محلول صبغة أزرق الكومازى بريليانت Commassie brilliant blue والذي يحضر على النحو التالى:

يضاف الى ١,٢٥ جم من الصبغة ١١٢,٥ مل من كحول الإيثانول + ٢٥ مل من حامض الخليك + ١١٢,٥ مل من الماء المقطر ليصبح الحجم النهائى لمحلول الصبغة ٢٥٠ مل .

- **محلول الإزالة Eluent :** محلول هيدروكسيد الصوديوم ٠,٠٢ عيارى (N ٠,٠٢ NaOH) والذي يحضر بإذابة ٠,٨ جرام من بللورات هيدروكسيد الصوديوم فى لتر من الماء المقطر.

- **محلول التثبيت:** محلول حامض الخليك ٥ % والذي يحضر بخلط ٥٠ مل من حامض الخليك المركز مع ٩٥٠ مل من الماء المقطر.

- **محلول الأجاروز:** يوزن ١ جم من الأجاروز النقي في دورق مخروطي ثم يضاف إليه ٥٠ مل من الماء المقطر و٥٠ مل من المحلول المنظم ويتم الإذابة بأحد الطرق التالية: استخدام حمام مائي عند درجة حرارة ٩٥ درجة مئوية لبضع دقائق أو الوضع فى فرن الميكروويف لبضع ثوان حتى يتم الذوبان الكامل ويصبح المحلول متجانسا.

طريقة العمل:

١- تجهيز الجل:

- توضع خلايا الصب الخاصة بجهاز اللأكترفوريسيس فى وضـــع أفقى تماما على البنش ويتم التأكد من ذلك باستخدام ميزان المياه المخصص لهذا الغرض ثم توضع الأمشاط Combs فى المكـــان المخصص لذلك لإحداث التجاويف الخاصـــة بوضـــع العينـــات ويصب محلول الأجاروز بنظام مع تجنب عدم تكون فقاقيع أثناء عملية الصب، وتترك الخلايا لتبرد.

- تنزع الأمشاط باحتراس ويوضع الجل فـــي مكانـــة المخـــصص بوعاء جهاز الفصل الكهربي (يلاحظ أن تكون تجاويف وضـــع العينات جهة القطب السالب) ويضاف المحلـــول المـــنظم إلـــي الوعاء حتى تمام تغطية الجل.

٢- وضع العينات:

توضع ٥ – ١٠ ميكروليتـــر (µl ١٠ – ٥) مـــن عينـــات البلازما المراد فصلها فى تجاويف وضع العينات علـــى الجـــل باستخدام ماصة ميكروميترية مع ملاحظة عـــدم لمـــس الجـــل المحيط بالتجويف وعدم فيضان العينة خارج التجويف ثم يضاف الى كل تجويف ٥ ميكروليتر من صـــبغة أزرق البروموفينـــول وذلك بهدف تتبع حركة البروتينات على الجل.

٣- الفصل الكهربى:

ضع الغطاء على وعاء جهاز الفصل الكهربي مع ضرورة

مراعاة أن تكون الجهة من الغطاء المكتوب عليها (+) مطابقة للقطب الموجب (فى حالة مخالفة ذلك فلن يمر التيار الكهربي) ويتم التشغيل لإجراء عملية الفصل الكهربى لمدة ٣٠ – ٦٠ دقيقة باستخدام جهد ثابت ١٢٠ فولت وتيار مقداره ٢ مللى أمبير.

٤- **التثبيت:**

بعد انقضاء المدة المقررة للفصل يرفع غطاء الجهاز وينقل الجل الى محلول التثبيت (حامض الخليك ٥ %) بهدف تثبيت المناطق البروتينية المفصولة على الآجار جل.

٥- **الصباغة:**

تجرى صباغة الجل بوضعة فى محلول الصبغة (أسود الأميد) لمدة ١٥ دقيقة حيث تمتص البروتينات المفصولة كمية من الصبغة تتناسب مع تركيزها.

٦- **الغسيل:**

ينقل الجل بعد انتهاء عملية الصبغ إلى حوض به محلول الغسيل (حامض الخليك ٢ %) حيث تكرر عملية الغسيل الى أن تصبح الشرائح شفافة ولا يظهر عليها سوى الأجزاء البروتينية المصبوغة التي تم فصلها ويتم تصويرها باستخدام كاميرات تصوير البولارويد المخصصة لذلك.

٧- **التقدير الكمى:**

- لإجراء التقدير الكمي لأجزاء البروتينات المفصولة، تقطع أجزاء الجل لكل بروتين على حده (الألبيومين Albumine – ألفا ١

جلوبيولين $\alpha_{۱}$ -globuline ، ألفا ۲ جلوبيـــولين $\alpha_{۲}$ -globuline ، بيتا جلوبيولين β- globuline) حيث توضع كل منها فى أنبوبـــة اختبار ويضاف الى كل أنبوبة ۲ مل من محلــول هيدروكـــسيد الصوديوم ۰,۰۲ عيارى ، وتوضع الأنابيب لمدة ۳۰ دقيقة فـــى حمام مائى على درجة ۳۷ درجة مئوية مع الرج الخفيــف مـــن وقت لآخر حتى يتم التأكد من استخلاص الصبغة فى المحلول.

- يتم تقدير الكثافة الضوئية لكل أنبوبة على حدة باستخدام جهـــاز الإسبكتروفوتوميتر Spectrophotometer علـــى طـــول مـــوجى ٦١٠ نانوميتر (nm ٦١٩) والذي يتم ضبط قراءته على الصفر باستخدام الماء المقطر.

- يقدر تركيز كل بروتين على حده باستخدام المعادلة التالية:

تركيز البروتين المفصول فى العينة A = $\frac{\text{الكثافة الضوئية للبروتين المفصول A على حده} \times \text{البروتين الكلى}}{\text{مجموع الكثافات الضوئية للأجزاء البروتينية المفصولة بذات العينة}}$

الفصل الكهربي على أعمدة من البولي أكريلاميد-جل
Polyacrylamide gel electrophoresis

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب زجاجية مفتوحة الطرفين ذات أبعاد ٠,٦ × ٥,٥ سم.
- أغشية بارافيلم Parafilm
- مخابير زجاجية بأحجـــام مختلفـــة ١٠٠، ٢٠٠ ، ٥٠٠ ، ١٠٠٠ مل.
- ساق زجاجية.
- جهاز ضبط الرقم الأيدروجينى pH meter
- جهاز الفصل الكهربى على أعمدة (الالكترفوريـــسيس) بجميـــع وحداته.

المحاليل المستخدمة:

- **محلـــول الأكريلاميـــد..** يـــذاب ١٥ جـــرام مـــن الأكريلاميـــد Acrylamide فى قليل من الماء المقطر ثم يضاف اليـــه ٠,٣٧٥ جرام بس-أكريلاميد Bis acrylamide، ثم يكمل حجم المحلـــول الى ١٠٠ مل بالماء المقطر ويرج جيدا للتجانس.
- **المحلول المنظم المركز..** ويحضر بإذابة المكونات التاليـــة فـــى ٥٠٠ مل ماء مقطر:

اسم المكون	الكمية بالجرام	التركيز النهائى بالمحلول
تريس Tris	٢١,٧	٣٦ ملليمول
فوسفات الصوديوم ثنائية الأيدروجين Sod. Dihydrogen phosphate. ٢ H_2O	٢٣,٤	٣٠ ملليمول

ثم يضبط الرقم الأيدروجينى للمحلول السابق الـــى ٧,٦ وذلـــك باستخدام أيدروكسيد الصوديوم أو حامض الأيـــدروكلوريك ٠,١ مولر ليصل رقم الـــpH الى ٧,٦ - ٧,٨ على درجة حـــرارة ٢٠ درجة مئوية، ثم يكمل حجم المحلول الى لتـــر باســـتخدام المـــاء المقطر.

طريقة العمل:

١- تحضير الجل:

يحضر الجل بالتركيز المطلوب والذي يعبر عنه بـــالتركيز المئوي (وزن -حجم) للأكريلاميد بالجل وذلـــك وفـــق الجـــدول التالي:

محلول الأكريلاميد (مل)	٥,٠	٥,٠	٥,٠	٥,٠
المحلول المنظم المركز(مل)	٦,٨	٦,٢٥	٣,٠	٢,٠
ماء مقطر (مل)	٢٢,٠	١٩,٧	٦,٧	٢,٧
تركيز الجل الناتج	٢,٢٠	٢,٤	٥,٠	٧,٥

ثم يضاف لمحلول الأكريلاميد ٢٥ ميكرميتـــر مـــن N,N,N,N,

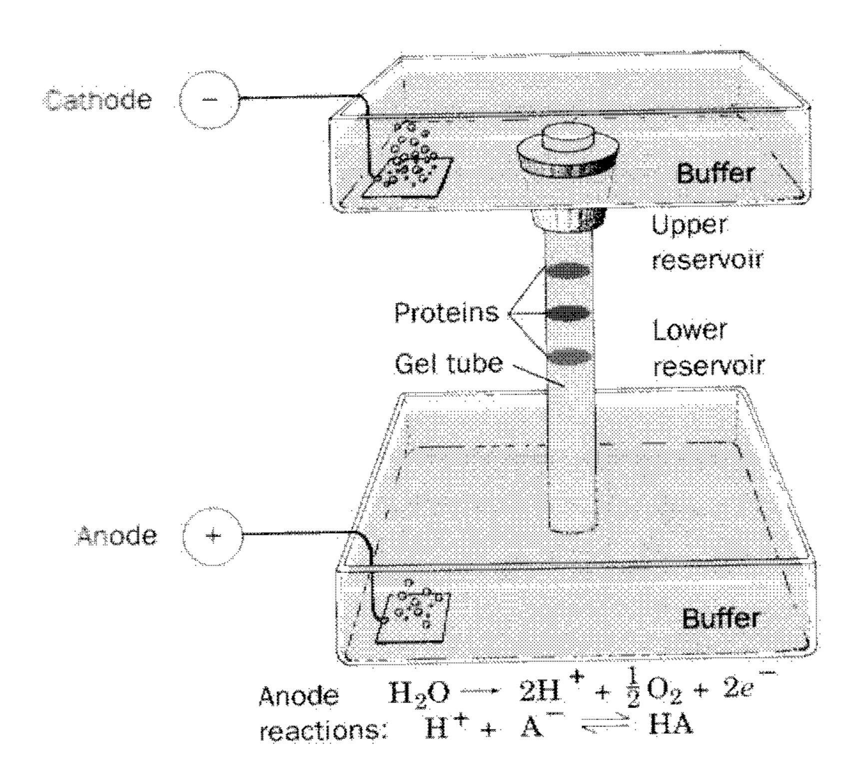
tetramethyl ethylene diamine (TEMED) مع الخلــط بــساق زجاجية ثم يضاف ٠,٢٥ مل من محلول فوق كبريتات الأمونيوم ١٠ % Ammonium persulphate والمحضر حديثا، ثم يخلــط المحلول جيدا.

٢- **أعداد أعمدة الفصل:**

تحضر أنابيب زجاجية مفتوحة الطرفين وذات أبعــاد ٠,٦ × ٨,٥ سم وتسد من أسفل بغشاء البارافيلم Parafilm ثم توضــع رأسيا فى حامل أنابيــب. تمــلأ الأنابيــب بــسرعة بمحلــول الأكريلاميد لإرتفاع يصل الى ٧ سم بالماصة، ثم يغطى ســطح الأنابيب بحرص بطبقة رقيقة من الماء المقطر وذلك لجعل سطح الجل مسطح تماما. ورغم أن الجل يتماسك فــى خــلال بــضعة دقائق الا أنه يفضل تركه لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفــة قبل الاستخدام.

٣- **الفصل الكهربي:**

تزال أغشية البارافيلم من أســفل أنابيــب الجــل الــسابق تجهيزها ثم تركب فى أماكنها المحددة بجهاز الألكتروفوريــسيس ثم يضاف محلول العينة فوق سطح الجل. ويراعى أولا تجهيــز محلول العينة قبل وضعها فوق ســطح الجــل بإضــافة ســكر السكروز اليها ليصبح تركيزه ١٠ % حتى تكون كثافة محلــول العينة أكبر من كثافة المحلول المنظم بجهاز الفصل وبالتــالى لا يحدث انتشار للعينة الى المحلول المنظم خارج الأنبوبة. ثم



الفصل بالالأكتروفوريسيس بنظام العامود

(Column electrophoresis apparatus)

يضاف أيضا الى محلول العينة ١٠٠ ميكرليتـــر مـــن محلـــول البروموفينول الأزرق Bromophenol blue (BPB) والتى تعمل

كدليل على انتهاء الفصل الكهربي عند سريانها للنهايـــة الـــسفلي لعمود الجل. يضبط منظم التيار الكهربي بجهاز الفصل بحيـــث يكون ٥ مللى أمبير لكل جل، وعقب انتهاء الفصل تنزع أنابيـــب الجل من الجهاز ثم يدفع بها ماء لإخراج الجل منها.

٤ – الصباغة:

يتم وضع الجل بعد ذلك في محلول الصبغة المناسب لمدة ســـاعة تقريبا، ثم يتم غسيل الجل بالمحلول المناســـب لإزالـــة الـــصبغة الزائدة. يتم ملاحظة الجزيئات المفصولة ونسبة وجودها بالنسبة لبعضها البعض وذلك باستخدام التخطيط الفوتومترى Scanning بالضوء العادي أو بالأشعة الفوق بنفسيجية أيهما أنسب.

الباب الثامن

طرق التقدير اللوني والطيفي للمركبات الحيوية

Colourimetry and Spectrophotometry

طرق التقدير اللوني والطيفي للمركبات الحيوية

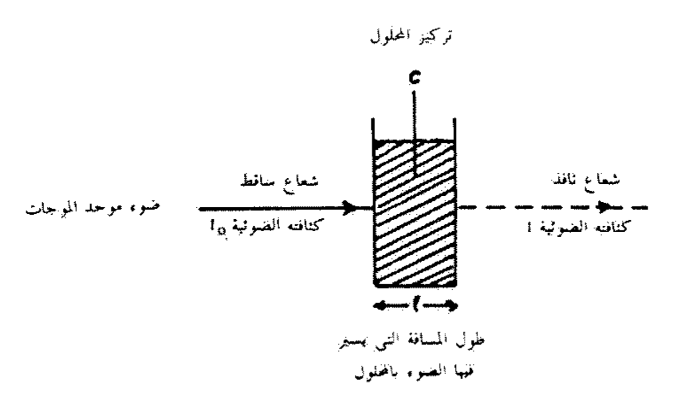
Colourimetry and Spectrophotometry

يلجأ الباحثون والعاملون في مجالات عديدة إلى قياس كمية من مركب أو مجموعة من المركبات التي توجد معا في محلول ما . وتعتبر طريقة التقدير اللوني (Colourimetry) من أكثر الطرق البيوكيميائية المستخدمة شيوعا في هذا التقدير. حيث تعتمد هذه الطرق على خاصية امتصاص المحلول الملون لبعض أطوال موجات الضوء _أكثر من غيرها وذلك عند مرور الضوء الأبيض (المرئي) بها. كما أن هناك الكثير من المركبات غير الملونة والتى يمكن جعلها تمتص الضوء فى نطاق الضوء المرئي (visible region) ، وذلك بعد تفاعلها مع كواشف كيميائية مناسبة suitable reagents ، حيث تكون هذه التفاعلات متخصصة وحساسة لدرجة كبيرة يمكن بواسطتها قياس كميات وتركيزات متناهية فى الصغر. كذلك فإن من أهم مميزات هذه الطريقة أنها لا تستدعى فصل المركب المراد تقديرة إذا ما كان مخلوط مع مركبات أخرى فى المحلول. والمثال على ذلك هو تقدير كمية الجلوكوز ببلازما الدم دون اللجوء الى فصل باقى المكونات الأخرى.

قانون بير – لامبرت The Beer - Lambert Law

عند مرور شعاع ضوئي ذو طول موجي واحد Mono chromatic light وذو كثافة ضوئية I، خلال محلول ما في وعاء شفاف مثل خلية من الكوارتز أو السليكا فإن بعضا من هذا الضوء

يمتص. لذا نجد أن كثافة الضوء النافذ I تقل عن كثافة الضوء الساقط I_0 كما هو موضح بالشكل التالي:



كما أن كمية ضئيلة جدا من الضوء الساقط تفقد كنتيجة للتشتت بواسطة جزيئات المحلول وكذلك الانعكاس على الأسطح الفاصلة .

إن العلاقة بين I , I_0 تعتمد على طول المسافة المار بها الضوء فى المحلول l كما قال لامبرت وكذلك على تركيز المحلول c كما قال بير.

$I = I_0 e^{-K, C}$ (Beer's law).

$I = I_0 e^{-K, L}$ (Lambert's law).

وبدمج القانونين معا نحصل على قانون بير-لآمبرت

$I = I_0 e^{K, CL}$ (Beer-Lambert law).

وتعرف النسبة بين كثافة الضوء النافذ إلـى كثافـة الـضوء الـساقط بالنفاذية Transmittance والتى يعبر عنها فى القانون السابق كالتالي:

$T = I / I_{\cdot} = e^{K, CL}$ (Beer-Lambert law)

وبأخذ اللوغاريتم للنفاذية تصبح المعادلة على النحو التالي:

$\log_e I_{\cdot} / I = K_٣ CL$

وبتحويل المعادلة السابقة إلى لوغاريتم للأساس ١٠ تصبح كالتالي:

$\log_{١٠} I_{\cdot} / I = ٢,٣٠٣ K_٣ CL$

وحيث أن حاصل ضرب الثابت $K_٣$ فى الرقم ٢,٣٠٣ ينتج رقم ثابـت جديد هو K فتصبح المعادلة كالتالي:

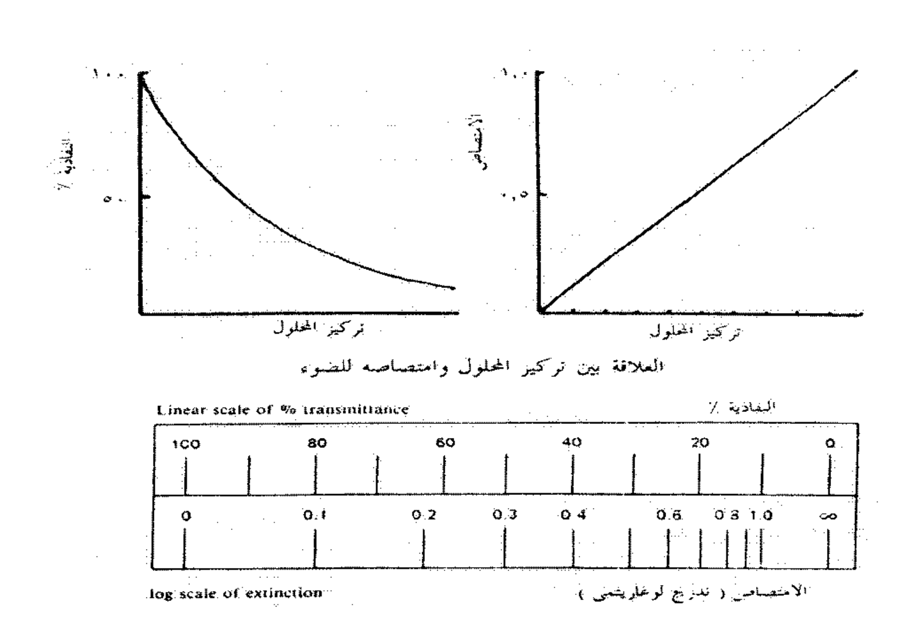
$\log_{١٠} I_{\cdot} / I = KCL$

ويسمى $\log_{١٠} I_{\cdot} / I$ بالامتصاص Absorbance (Abs) أو Extinction (E) وتكتب المعادلة على النحو التالي:

$Abs = E = KCL$

ويلاحظ أنه عند تطبيـق قـانون بيـر – لامبـرت Beer-Lambert Law عمليا بحيـث يكـون المتغيـرات همـا التركيـز والامتصاص مع تثبيت طول المسافة التي يمر بها الـضوء I والتـى تمثل عرض الخلية المحتوية على المحلول. ثم تمثيل العلاقـة بـين الامتصاص (E) وتركيز المحلول(c) بيانيا فإننا نحصل علـى خـط مستقيم يمر بنقطة الأصل، بينما إذا رسمت العلاقة بين النفاذية (T%) والتركيز (c) لنفس المحلول فإننا نحصل على منحنى.

ويلاحظ أن أغلب أجهـــزة القيـــاس اللـــونى Colourimeters والإســـــــــبكتروفوتومترى والمعـــــــــروف بالقيـــــــــاس الطيفى Spectrophotometers تحتوى على تدريجين أحداهما تـــدريج عادى يمثل النفاذية % والآخر تدريج لوغاريتمى يمثل الإمتصاص Exinction كما هو موضح بالأشكال التالية:



العلاقة بين تركيز المحلول وامتصاصه للضوء

العلاقة بين النفاذية والامتصاص

الامتصاص (E) = ٢- لوغاريتم النفاذية أو لوغاريتم ١٠٠/النفاذية

وتستخدم العلاقة بين قراءات التدريج اللوغاريتمى والتركيز فى رسم المنحنى القياسي لمادة ما كما هو موضح بالشكل السابق والتى من الممكن استخدامه فى معرفة تركيز محلول مجهول التركيز من هذه المادة وذلك إذا ما قيس امتصاصها Exinction للضوء عند طول الموجة التي يتم إعداد المحنى القياسي عندها، أي تحت نفس الظروف.

ملحوظة هامة:

عند قياس محاليل المواد بالأجهزة السابقة فإنه يجب مراعاة عدة نقاط هامة منها :

١- يجب القياس عند طول موجة معينه وهى طول الموجة التي يكون عندها أقصى قدرة لامتصاص الضوء (Maximum absorption)حيث تكون أكثر حساسية .

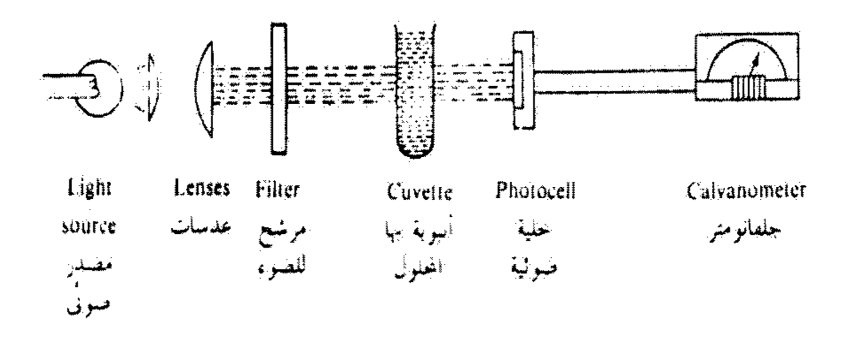
٢- يجب أن تقدر الكثافة اللونية للمحلول خلال مدة زمنية محددة لا تتعداها تبعا لنوع المحلول المراد قياسه لكي تكون الناتج قياسية دقيقة.

٣- يجب أن يكون المحلول مركزا جدا بحيث يمتص جميع الضوء الساقط عليه قدر الإمكان.

قياس درجة الامتصاص الضوئي للمحاليل

أولا: القياس الفوتوميترى Photometry

يعتمد القياس اللوني الأولى على العين المجردة فى التميز بين الألوان حيث يقارن لون المحلول المجهول التركيز بألوان عدد من المحاليل الأخرى معلومة التركيز، فإذا تشابه لون المحلول المجهول مع أحد هذه المحاليل المعلومة فإنه يكون مساويا له في التركيز. ومن الطبيعي أن هذه الطريقة ليست دقيقة غير أنها تحتاج إلى تحضير عدد من المحاليل المعلومة التركيز في كل مرة، لذلك فقد أصبحت هذه الطريقة غير مستخدمة منذ سنوات عديدة. وحيث أن الخلية الضوئية الكهربية Photoelectric cell تفوق العين المجردة في تقدير الكثافة اللونية والضوئية فقد لجأ إلى استخدامها في أجهزة القياس اللوني كما سيرد شرحه فيما يلي.



جهاز الفوتوميتر Photoelectric colorimeter

بالنظر إلى الشكل السابق والذي يوضح شكلا توضيحيا لجهاز الفوتوميتر ومكوناته حيث يلاحظ أن الضوء المنبعث من مصدر ضوئي ينفذ من ثقب فى حائل، ثم يمر فلتر زجاجي ملون يعمل

مرشح للضوء وهذا الفلتر لا يسمح إلا للأشعة الضوئية ذات أطـــوال موجية معينة بالمرور خلاله، وهذا يعتمد على كل مـــن لـــون الفلتـــر ولون المحلول المراد قياسه .

مثال :

إذا كان المحلول المراد قياس الامتصاص لـــه ذو لـــون أزرق فإنه يوضع فلتر زجاجي أحمر اللون حيث يختار لون الفلتـــر بحيـــث يكون مكملا للون المحلول كما هو مذكور بالجدول التالي:

العلاقة بين لون المحلول ولون الفلتر المطلوب اختياره

لون المحلول المراد قياسه	لون الفلتر المطلوب
أحمر – برتقال	أزرق – أزرق مخضر
أزرق	أحمر
أخضر	أحمر
بنفسجي	أخضر
أصفر	بنفسجي

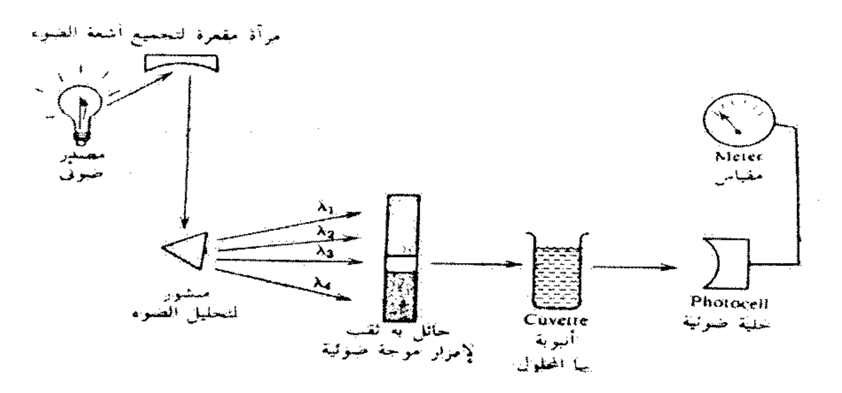
ثم يمر الشعاع النافذ من الفلتر خلال المحلول الموضوع فـــي خلية من الكوارتز أو السليكا (ذات أبعاد ١×١×٣ سم عـــادة) حيـــث يمتص المحلول بعضا من الضوء الساقط، وينفذ البعض الآخـــر مـــن المحلول ليسقط على الخلية الضوئية Photo cell حيث ينتج عنه تيار

كهربي تتناسب كميته مع كمية الضوء الساقط على الخليـــة الــضوئية حيث يمكن بسهولة قياس كمية هذا التيار الكهربي بواسطة جلفانومتر.

ورغم ذلك فإن هذه الأجهزة قليلة الاستعمال فى الوقت الحالي حيث قد تم تطويرها واستبدلت بالإسبكتروفوتومترات والتـــى تعـــرف بأجهزة القياس الطيفي.

ثانيا: القياس الطيفي (سبكتروفوتومترى) Spectrophotometry

تتميز أجهزة القياس الطيفي العادية بوجـــود منـــشور Prism لتحليل الضوء إلى أطوال مختلفة من الموجات، حيث يمكن فصل كل طول موجي عن الآخر على حدة وذلك بتمرير الضوء المحلل الـــذي يعرف بالطيف spectrum خلال فتحة ضيقة slit تسمح بمرور طـــول موجي واحدmonochromatic light كما هو موضح بالشكل التالي:

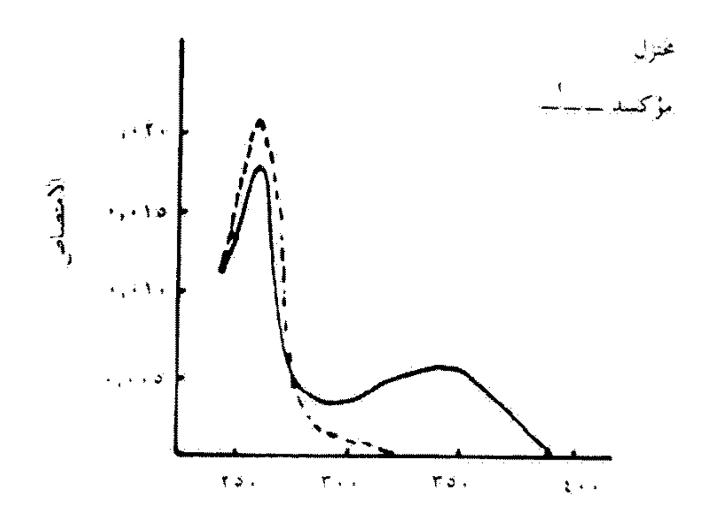


جهاز القياس الطيفي (سبكتروفوتومترى)
Spectrophotometry

وتمتاز أغلب أجهزة الإسبكتروفوتومترات بأنها تكون مــزودة بمصدر آخر للإشعاع الضوئي الفوق بنفــسجي UV-lamp حيــث أن بعض المواد (غالبا الغير ملونه) تمتص الضوء الفوق بنفسجي بدرجة كبيرة عند أطوال موجات تختلف باختلاف المادة .

والمثال على ذلك، يمتص محلول الأحماض النوويــة الــضوء فوق البنفسجي لدرجة كبيرة عند موجة ضوئية طولها ٢٦٠ نــانوميتر (nm)، وتمتص محاليل البروتينيات الضوء فوق البنفسجي عند موجــة ضوئية طولها ٢٨٠ نانوميتر بينما حمــض اليوريــك uric acid فإنــه يمتص الضوء عند طول الموجة ٢٩٣ نانومتر وذلــك فــى الوســط القلوى. pH = ٩,٠

ولمعرفة طول موجة الــضوء التــي يحــدث عنــدها أكبــر امتصاص للضوء من قبــل مــادة مــا يرســم منحنــى امتــصاص Absorption spectrum لمحلول هذه المادة كما هو موضــح بالــشكل التالي والذي يوضح الامتصاص الضوئي لمحلــول NAD المختــزل والمؤكسد:



منحنى الامتصاص الضوئي لمحلول الـــ NAD المختزل والمؤكسد

حيث يتم الرسم لهذا المنحنى عن طريق تقـــدير الامتـــصاص الضوئي لمحلول المادة عند أطوال موجـــات تـــصاعديا ابتـــداءا مـــن الموجة التي طولها ١٩٠ نانوميتر حتى الموجة الضوئية التي طولهـــا ٣٩٠ نانوميتر، وذلك إذا ما كانت المادة تمتص الضوء فوق البنفسجي واكثر من ذلك إلى ٨٠٠ نانوميتر إذا كانت المادة ملونـــة. ثـــم يمثـــل منحنى الامتصاص بيانيا بحيث يوضح العلاقة بين الامتصاص وطول الموجة كما هو موضح سابقا. كذلك توجد الآن بعض أجهزة القيـــاس الإسبكتروفوتومترى المتطورة والتى تقوم برســـم المنحنـــى القياســـي أوتوماتيكيا.



جهاز القياس الطيفي (سبكتروفوتوميتر)

Spectrophotometer

تقدير البروتين كميا فى بلازما الدم بطريقة البيوريت

Plasma protein assay by the Biuret method

فكرة التجربة:

تبنى فكرة هذه الطريقة على مقدرة المجـاميع الببتيديـة فـي جزيئـات البـروتين protein peptide bonds والببتيـدات العديـدة polypeptideعلى تكوين مركبات معقدة ذات لـون بنفـسجي violet color عند تفاعلها مع أيونات النحاس (Cu^{2+}) في الوسـط القاعـدي كما هو موضح بالشكل التالي:

معقد البيوريت الملون

Colored biuret complex

ولقد لوحظ أن كثافة اللون الناتج يتناسب طرديا مع تركيز البـــروتين في الوسط. ويمكن تقدير البروتين الذائب بهذه الطريقة عندما يكـــون تركيز البروتين بالمحلول في حدود ١،. – ٥ ملجم /مل. فإذا كان من المتوقع أن يكون تركيز المحلول أكثر من ذلك فإنه يجب تخفيفه لكـــي يكون فى هذا النطاق، أما إذا كان تركيز المحلول المتوقع أقل من ١،. ملجم / مل فتستخدم طريقة لورى كما سيرد شرحه فيما بعد.

الأدوات المستخدمة:

- حمام مائي كهربي.
- أنابيب اختبار نظيفة وجافة.
- جهاز سبكتروفوتوميتر Spectrophotometer
- عينات البلازما

المحاليل اللآزمة:

- محلول كلوريد صوديوم ٠,٩ %: يحضر بخلط ٩ جـــرام مـــن كلوريد الصوديوم مع ٩٩١ مل من الماء المقطر.
- محلول بيوريـــت Biuret reagent : يحـــضر بإذابـــة ٣ جـــرام كبريتات نحاس ($CuSO_4-5H_2O$) مع ٩ جـــرام ملـــح روشـــل (طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم) في ٥٠٠ مل من هيدروكسيد الصوديوم ٢،. مولر ثم يضاف ٥ جرام يوديد بوتاسيوم. يـــرج المحلول جيدا ثم يكمـــل الحجـــم إلـــى لتـــر بواســـطة محلـــول هيدروكسيد الصوديوم ٢،. مولر مـــع ضـــرورة رج المحلـــول النهائي جيدا لتجانس مكوناته.

- محلول ألبيومين قياسي ١٠%: يحضر بإذابة ١ جرام من البيومين سيرم الدم Bovine serum albumin في الماء المقطر ويكمل الحجم الى ١٠ مل بالماء المقطر ليصبح تركيز البروتين فى المحلول الناتج ٠,١ جرام/مل (١٠٠ جرام/لتر).

<u>طريقة العمل:</u>

أولا: إعداد المنحنى القياسي لتقدير البروتين:

١- ترقم أربعة أنابيب اختبار نظيفة جافة ثم تستخدم في تحضير محاليل قياسية أخرى للبروتين ذات تركيزات ٤٠، ٦٠، ٨٠ ، ١٠٠ جرام/لتر وذلك بتخفيف محلول الألبيومين القياسي الأصلي ١٠% بواسطة محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩ % وذلك وفق ما هو موضح بالجدول التالي:

رقم المحلول	الكمية المضافة من محلول الألبيومين القياسي ١٠% (مل)	الكمية المضافة من محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩% (مل)	تركيز البروتين فى المحلول الناتج (جم/لتر)	الامتصاص الضوئي
١	٠,٤	٠,٦	٤٠	
٢	٠,٦	٠,٤	٦٠	
٣	٠,٨	٠,٢	٨٠	
٤	١,٠	---	١٠٠	

٢- ينقل ٠,١ مل من كل محلول من المحاليل الأربعة السابقة إلى أنبوبة اختبار أخرى نظيفة وجافة ثم يضاف إليه ٥ مل من كاشف البيوريت وتخلط المحتويات جيدا بالرج وتحفظ بحمام مائي على درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة لحدوث التفاعل.

٣- يجرى إعداد محلول البلانك بخلط ٠,١ مل من محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩% الى ٥ مل من كاشف البيوريت.

٤- يقاس الامتصاص الضوئي للمحاليل السابقة عند طول موجي ٥٤٠ - ٥٦٠ نانوميتر بعد استخدام المحلول البلانك لضبط الجهاز على التدريج صفر.

٥- يتم رسم المنحنى القياسي الذي يوضح العلاقة بين الامتصاص الضوئي لكل محلول (على المحور الصادي) وتركيز محاليل البروتين جم/لتر (على المحور السيني) على ورقة رسم بياني.

ثانيا: قياس البروتين في عينات البلازما

١- تجهز عدد ٢ أنبوبة اختبار نظيفة وجافة حيث ينقل إلى الأولى ٠,١ مل من عينة البلازما (العينة) وفى الأخرى ٠,١ مل من محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩% (كنترول) ثم يضاف إلى كل أنبوبة ٥ مل من كاشف البيوريت وتخلط المحتويات جيدا بالرج وتحفظ بحمام مائي على درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة لحدوث التفاعل.

٢- يقاس الامتصاص الضوئي لمحلول العينة عنـــد طـــول مـــوجي ٥٤٠ - ٥٦٠ نانوميتر بعد استخدام المحلول البلانـــك لـــضبط الجهاز على التدريج صفر.

٣- يستنتج من المنحنى القياسي تركيـــز البـــروتين للعينـــة وذلـــك بمعلومية مقدار امتصاصه للضوء.

تقدير البروتين كميا في السوائل البيولوجية بطريقة لورى

Biological fluids protein assay by the Folin-Lowry method

نظرية العمل:

تستخدم هذه الطريقة في تقدير تركيز البروتين الذائب في محلوله عندما يكون ذو تركيز منخفض (أقل من واحد ملليجرام / مل من المحلول) كما هو الحال فى البول حيث يكون تركيز البروتين في صورة آثار trace amount ، فإذا كان المحلول المراد تقديرة من المتوقع أن يكون تركيز البروتين الذائب به أكثر من ذلك، فإنه يلزم في هذه الحالة تخفيف المحلول أولا ثم بعد إجراء التقدير تضرب نتيجة التقدير في مقلوب التخفيف.

الأدوات المستخدمة:

- حمام مائي كهربي.
- أنابيب اختبار نظيفة وجافة.
- جهاز سبكتروفوتوميتر Spectrophotometer
- عينات بول

المحاليل اللازمة:

- محلول كلوريد صوديوم ٠,٩ %: يحضر بخلط ٩ جرام من كلوريد الصوديوم مع ٩٩١ مل من الماء المقطر.
- محلول ألبيومين قياسي ٠,٠٥%: يحضر بإذابة ٠,٠٠٥ جرام من البيومين سيرم الدم Bovine serum albumin في الماء

المقطر ويكمل الحجم إلى ١٠ مل بالماء المقطر ليصبح تركيــز البروتين فى المحلول الناتج ٥٠٠ ميكروجرام / مل.

- محلول A وهو محلول يحتوى على كربونـــات صـــوديوم (٢%) وهيدروكسيد صوديوم (٠,١ ع)
- محلول B وهو محلول يحتوى على كبريتـــات نحـــاس (٠.٥%) وملح روشيل (طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم ١%).
- محلول كبريتات النحاس القلوي: وهو ينتج من خلط ٥٠ مل من المحلول A مع واحد مل من المحلول B ويراعى اجراء الخلــط قبل إجراء التجربة مباشرة .
- محلول فولن Folin & Ciocalteu's reagent (٠,٢ عيارى) .

خطوات العمل:

أولا: إعداد المنحنى القياسي لتقدير البروتين:

١- ترقم خمسة أنابيب اختبار نظيفة جافة ثم تستخدم فـــي تحــضير محاليل قياسية أخرى للبـــروتين ذات تركيـــزات ١٠٠، ٢٠٠، ٣٠٠ ،٤٠٠، ٥٠٠ ميكروجرام / مل وذلك بتخفيــف محلــول الألبيومين القياسي الأصلي ٥٠٠ ميكروجرام / مــل بواســطة محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩ %

٢- ينقل بالضبط ١ مل من كل محلول من المحاليل الأربعة الــسابقة إلى أنبوبة اختبار أخرى نظيفة وجافة ثم يــضاف إليــه ٥ مــل

بالضبط من محلول كبريتات النحاس القلوي وتخلط جيدا وتترك لمدة ٥ دقائق على درجة حرارة الغرفة .

٣- يضاف ٠,٥ مل من محلول فولن (Folin) بسرعة الى كل أنبوبة ويترك لمدة نصف ساعة على درجة حرارة الغرفة .

٤- يجرى إعداد محلول بلانك وذلك بإجراء نفس الخطوات السابقة مع استخدام ١ مل محلول كلوريد صوديوم ٠,٩ % بدلا من استخدام محلول البروتين .

٥- تقاس كثافة اللون لكل محلول من المحاليل السابقة على طول موجي مقداره ٧٥٠ نانوميتر وذلك بعد ضبط قراءة الجهاز (الامتصاص) إلى صفر التدريج باستخدام محلول البلانك.

٦- يرسم المنحنى القياسي ليوضح العلاقة بين تركيزات محاليل البروتين ممثلة على المحور السيني وامتصاصها للضوء ممثلة على المحور الصادي.

ثانيا: تقدير تركيز محلول بروتين مجهول التركيز

١- تكرر الخطوات السابقة ولكن باستعمال محلول البروتين المجهولة التركيز (العينة).

٢- بعد قياس مقدار الامتصاص الضوئي للمحلول البروتيني المجهول التركيز يستنتج تركيزه من المنحنى القياسي الذي تم إعداده في الخطوات السابقة.

الباب التاسع

الامتصاص الذرى

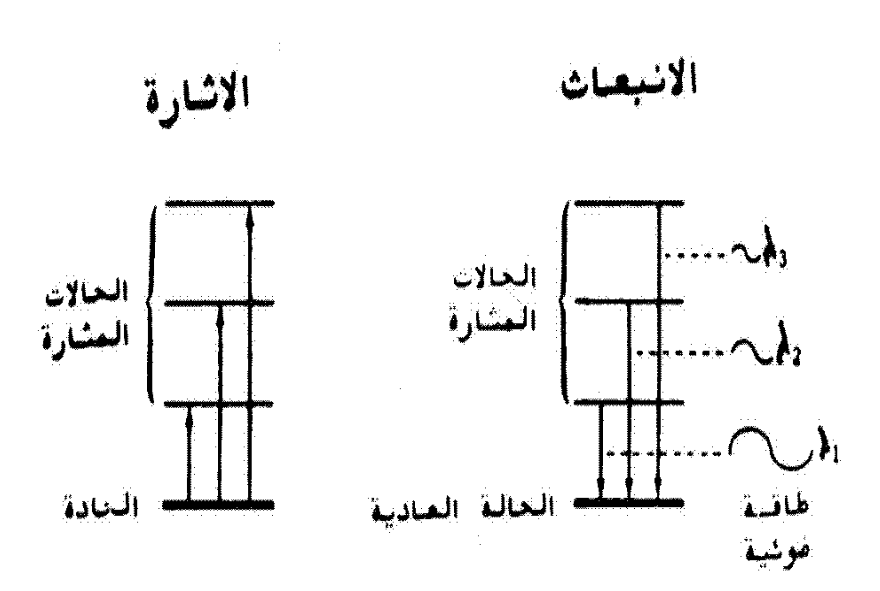
Atomic absorption

الامتصاص الذرى
Atomic absorption

نظرية العمل:

الامتصاص الذرى هو العملية التي يتم من خلالها امتصاص ذرات العنصر Metal الموجودة على حالتها المنفردة العادية ground state الأشعة الضوئية عند طول موجي معين وتنتقل إلى الحالة المثارة excited state ، حيث تزداد كمية الأشعة الممتصة عند هذا الطول الموجي بزيادة عدد ذرات العنصر التي تعترض مسار الأشعة. ويتم دراسة العلاقة بين كمية الأشعة الممتصة وتركيز العنصر المراد تقديره من خلال استخدام مادة قياسية لنفس العنصر معلومة التركيز في إعداد منحنى قياسي Standard curve يوضح العلاقة ما بين كثافة الامتصاص الضوئي وتركيز العنصر فى المادة القياسية، ثم يتم تقدير العنصر فى العينة المجهولة بقياس الامتصاص الضوئي لهذه العينة ومن خلاله يمكن حساب التركيز بالاستعانة بالمنحنى القياسي السابق إعداده من قبل.

ويجب الأخذ في الاعتبار أنه لكي تتم عملية الامتصاص الذرى (الانتقال الإلكتروني) فإنه يجب أن تكون طاقة الأشعة ($E = h\nu$) مساوية للفرق في الطاقة (ΔE) بين مستوى الطاقة الذي يوجد به الإلكترون وأحد مستويات الطاقة الأخرى الغير مشغولة بالإلكترونات. كما يلاحظ أن الذي يقاس فى عملية الامتصاص الذرى هو كمية الأشعة الممتصة Absorbed radiation على الطول الموجي المحدد



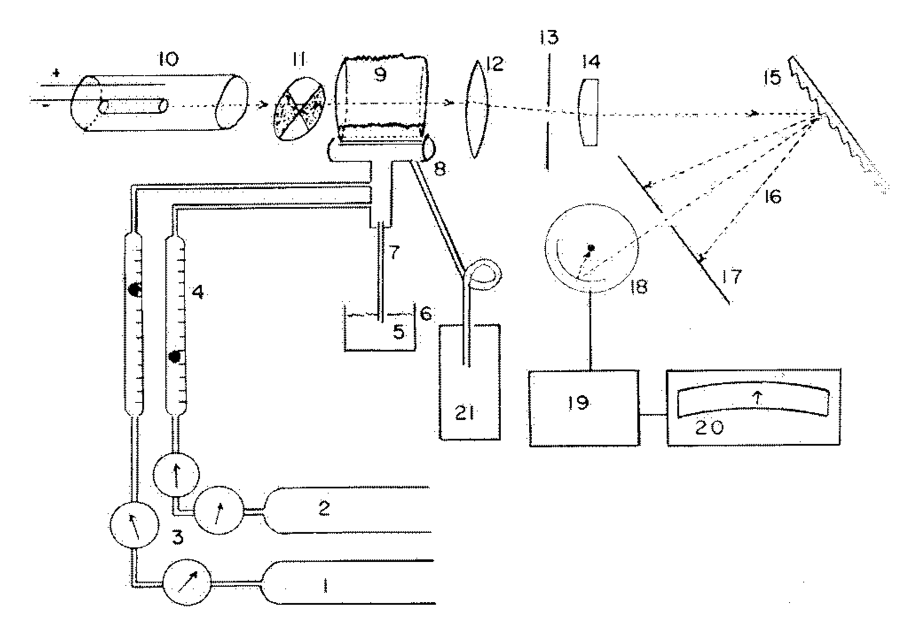
الإثارة الذرية والانبعاث الذرى الذي يتم على أطوال موجية محددة لكل عنصر

الذي يحدث عنده الانتقال الإلكتروني عند مرور الأشعة الضوئية على ذرات العنصر وبالتالي فعند اختيار الطول الموجى المناسب الذي يحدث عنده الامتصاص لعنصر ما دون العناصر الأخرى، فإنه يمكن بسهولة تقدير هذا العنصر في وجود العناصر الأخرى.

يستلزم لإجراء التقدير الكمي لعنصر ما أن يتم أولا تحويل هذا العنصر من صورته المرتبطة الى الصورة الحرة وذلك بتعريض المركبات التى يحتويها العنصر إلى طاقة حرارية كافية لكسر الروابط الكيميائية في الجزيئات وانفراد العنصر في صورته الذرية، حيث يتم ذلك عمليا برش رذاذ من محلول المركب فى لهب ذو درجة حرارة معينة كافية لإنفراد ذرات العنصر فى حالته العادية ground state والتى يكون لها القدرة على امتصاص الأشعة الضوئية والتحول الى الحالة المثارة exited state.

جهاز الامتصاص الذرى

يتكون جهاز الامتصاص الذرى بصفة عامة من الوحدات الأساسية التالية:



رسم توضيحي للمكونات الأساسية لجهاز الامتصاص الذرى

١- أسطوانة الغاز (الوقود)
٢- اسطوانة المادة المؤكسدة
٣- صمام التحكم فى الضغط
٤- مقياس انسياب الغاز
٥- محلول العينة
٦- خلية العينة
٧- أنبوبة سحب العينة
٨- رذاذ العينة
٩- قوس اللهب
١٠- لمبة الكاثود المفرغة
١١- قاطع ميكانيكي متناوب

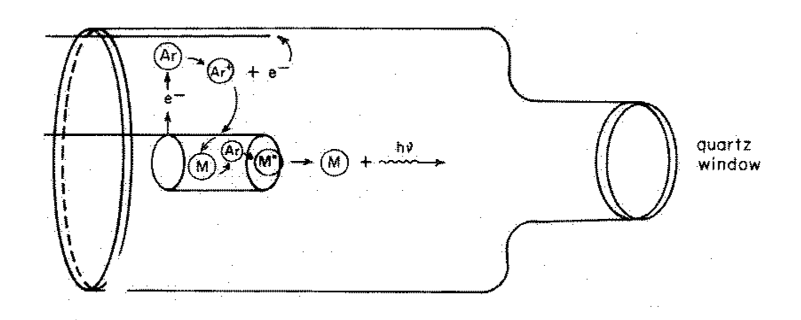
١٣- عدسات التكثيف
١٤- فتحة دخول الأشعة
١٥- عدسات التجميع
١٦- محزوز الحيود
١٧- الأشعة المنعكسة
١٨- فتحة خروج الأشعة
١٩- الخلية الضوئية
٢٠- مكبر
٢١- مسجل
٢٢- مصيدة الغازات والعادم

١- مصدر الأشعة Radiation source

تتلخص وظيفة هذه الوحدة فـــي إثـــارة الـــذرات excitation وذلك عن طريق إنتاج الطيف الخطى ذو الأطوال الموجية القصيرة ، ونظرا لأن كل عنصر من العناصر المختلفة يحتاج إلـــي أشـــعة ذات طول موجي محدد لإثارته فإنه يستخدم في اغلب أجهزة الامتــصاص الذرى لمبة الكاثود المفرغة Hollow cathode lamp ، حيــث يــتم تخصيص لمبة لكل عنصر يكون الكاثود Cathode فيها مكونـــا مـــن العنصر المراد تقديره وتسمى باسم العنصر لذا يقال لمبة الـــصوديوم ولمبة الزئبق ولمبة الكادميوم الخ.

وتتلخص نظرية العمل بلمبة الكاثود بإحداث فرق جهـــد بـــين الكاثود والأنود، والذي يؤدى بدوره إلى تأين بعض جزيئـــات الغـــاز الحامل مثل الأرجون أو النيون إلى أيونات موجبة تتحـــرك بـــسرعة كبيرة فتصطدم بجدار الكاثود مؤدية إلي انفصال بعض ذرات العنصر المكون لجدار الكاثود (A) والتى باصطدامها بأيونات الغاز يحدث لها إثارة excitation وتتكون الذرات المثـــارة (A^+). ثـــم تفقـــد تلـــك الذرات المثارة طاقتها مرة أخرى فى صورة إشعاع نتيجة تحولها إلي الحالة العادية (A) مرة أخرى.

وهنا يجب ملاحظة أن الأشعة الناتجة عن عمليـــات الانبعـــاث بداخل لمبة الكاثود تكون مميزة للعنصر المصنع منه الكاثود، ولـــذلك تستخدم في إثارة نفس العنصر إذا ما أريد تقـــديرة، حيـــث أن طاقـــة الفوتونات لهذه الأشعة تكون مساوية للطاقة اللازمة لحـــدوث انتقـــال إلكتروني أو إثارة لنفس العنصر.



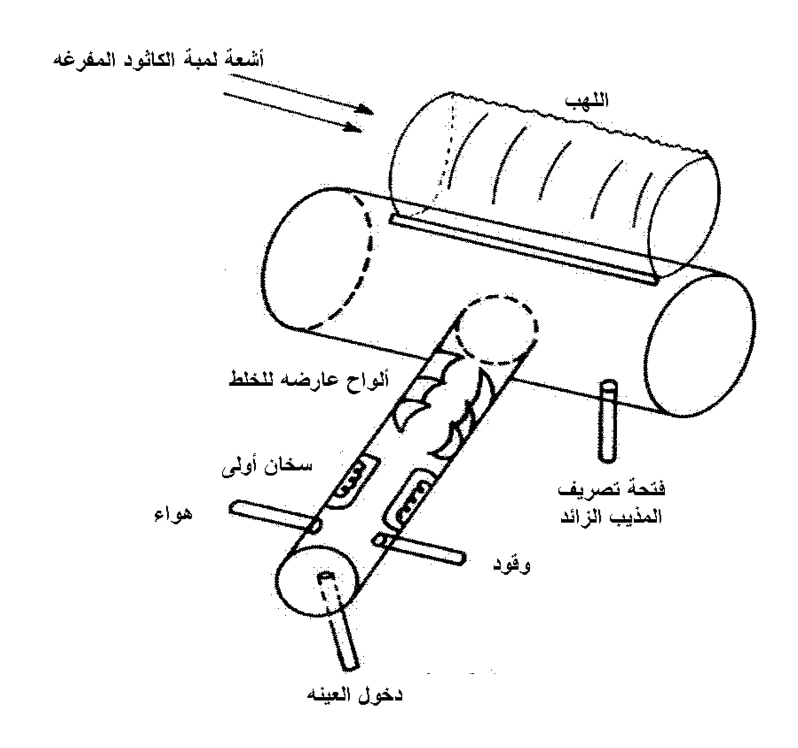
لمبة الكاثود المفرغة فى جهاز الامتصاص الذرى

٢- وحدة الاحتراق (الرذاذ) Burner or atomizer

يتم بواسطة هذه الوحدة تحويل العناصر المراد تقديرها من صورتها المرتبطة في مركباتها إلى الصورة الذرية العادية. ولعل من أكثر الطرق شيوعا فى الاستخدام هو حرق محلول من المادة في لهب وذلك بسحب محلول من المادة ثم رشه في صورة رذاذ دقيق في اللهب، حيث تؤدى درجة الحرارة إلى إحداث تفكيك للروابط الموجودة في الجزيئات لتتحول إلى ذرات حرة في صورتها العادية لتقوم بامتصاص الأشعة السابق توليدها بواسطة لمبة الكاثود المفرغة، والتى يجب أن تكون طاقة الفوتون لها المارة على اللهب مساوية لطاقة الانتقال الإلكتروني لذرات العنصر المراد تقديره فقط حتى نضمن عدم تداخل ذرات عناصر أخرى مكونة للمركب فى التقدير.

ويتلخص نظام التشغيل في وحدة الاحتراق في ضخ غاز الوقود والمادة المؤكسدة من أسفل وحدة الاحتراق لتقابل عند قمة اللهب رذاذ العينة الذي يتم سحبه بواسطة الهواء ويتم الخلط

والاحتراق. وحديثا أدخل تعديل على تلك الوحدة ليسمح بإجراء خلــط العينة مع غاز الوقود والمادة المؤكسدة فى وحدة مستقلة يطلق عليهــا وحدة الخلط قبل الاحتراق Premix burner حيث يتم فيهــا ســحب رذاذ العينة ورشه بواسطة تيار من المادة المؤكسدة ليتم خلطهــا بعــد ذلك مع غاز الاحتراق على أسطح ألواح عارضة Buffles ، وبعــد اتمام الخلط يدفع المخلوط الى فتحة الإحتراق. ويوضح الجدول التالي أهم الغازات والمواد المؤكسدة الشائع استخدامها كوقــود فــى عمليــة الاحتراق



تركيب وحدة الاحتراق فى جهاز الامتصاص الذرى

أهم الغازات والمواد المؤكسدة الشائع استخدامها كوقود في عملية الاحتراق

الوقود	المادة المؤكسدة	درجة الحرارة (درجة مئوية)
الأستلين	الهواء	٢١٢٠ – ٢٤٠٠
الأستلين	الأكسجين	٣٠٥٠ – ٣١٣٠
الأستلين	أكسيد النتروز	٢٦٠٠ – ٢٨٠٠
البروبان	الأكسجين	٢٨٠٠
البروبان	الهواء	١٩٢٥
الغاز الطبيعي	الهواء	١٧٠٠ – ١٩٠٠
الهيدروجين	الهواء	٢٠٠٠ – ٢٠٥٠
الهيدروجين	الأكسجين	٢٥٥٠ – ٤٧٠٠

٣- وحدة فصل الأطوال الموجية Monochromator

تتلخص وظيفة وحدة فصل الأطوال الموجية في فصل الأشعة ذات الطول الموجي المناسب للعنصر المحدد المراد تقديرة عن باقي الأطوال الموجية الأخرى حتى لا يحدث تداخل لبعض العناصر الأخرى الموجودة في حيز اللهب في التقدير، ويتم ذلك بإمرار الأشعة الناتجة بعد الاحتراق خلال فتحة صغيرة Entrance slite إلى مرآة تعكسها على سطح محزوز Grating يقوم بفصل وتفريد الأطوال الموجية لاختيار الأشعة ذات الطول الموجي المطلوب، والتى تمر بدورها إلى وحدة القياس فيما بعد. ويطلق على هذا النوع من أجهزة الامتصاص الذرى اسم أجهزة الامتصاص ذات الحزمة الواحدة Single beam atomic absorption.

ولقد أدخل حديثا تعديل على هذا النوع من الأجهزة يتم من

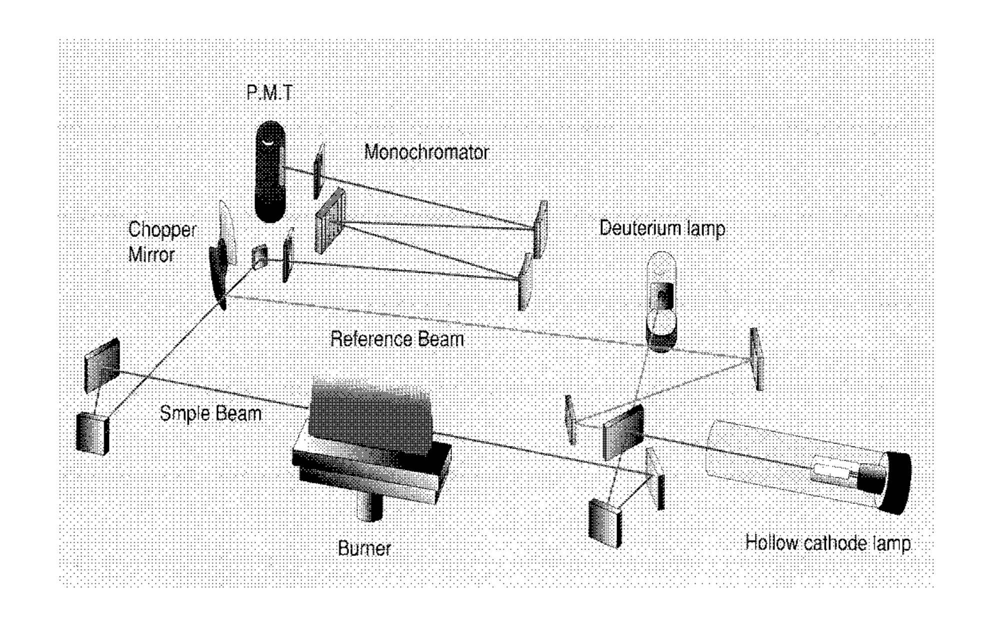
خلاله فصل أشعة المصدر إلي حـــزمتين بواســطة فاصـــل Splitter يمران موازيان لبعضهما البعض، يوجه إحداهما إلى منطقـــة اللهـــب حيث تعترضه رذاذ العينة ويحدث الامتصاص ويطلق عليه Sample beam . أما حزمة الأشعة الأخرى فتمر بعيدة عـــن منطقـــة اللهـــب ويطلق عليها Reference beam، ثم يعاد خلط الحزمتين معا ويمـــران عبر وحدة فصل الأطوال الموجية للقياس، لذلك يطلق على هذا النوع من أجهزة الامتصاص الذرى اسم أجهزة الامتصاص ذات الحـــزمتين Double beam atomic absorption. ويوضح الجدول التالي الطـــول الموجي المستخدم في تقدير بعض العناصر الهامة والحدود الـــصغرى للكشف عنها بواسطة الامتصاص الذرى

٤- وحدة قياس طاقة الأشعة Detector

تستخدم لهذا الغرض خليـــة ضـــوئية مـــن النـــوع المركـــب Photomultiplier tube والتى تقوم بتحويل الطاقة الإشعاعية الناتجـــة من وحدة فصل الأطوال الموجية إلى إشارة كهربيـــة يمكـــن قياســـها والتعبير عنها بواسطة وحدة الامتصاص (A) Absorption أو النفاذية Transmittance (T) .

الطول الموجي المستخدم في تقدير بعض العناصر الهامة والحدود الصغرى للكشف عنها بواسطة الامتصاص الذرى

العنصر	الرمز	الطول الموجي أنجسترو م	الحدود الصغرى للكشف بأجهزة الامتصاص الذرى ميكروجرام/١٠٠ مل عينة
الصوديوم	Na	٥٨٩٠	٠,٠٣
البوتاسيوم	K	٧٦٦٥	٠,٠٣
الماغنسيوم	Mg	٢٨٥٢	٠,٠١
الكالسيوم	Ca	٤٢٢٧	٠,٠٨
الأنتيمون	Sb	٢١٧٦	٠,٥
الزرنيخ	As	١٩٣٧	٥
الباريوم	Ba	٥٥٣٦	٨
البزموت	Bi	٢٢٣١	١
الألومنيوم	Al	٣٠٩٣	١
القصدير	Sn	٢٨٦٣	٥
الزنك	Zn	٢١٣٩	٠,٠٣
الكادميوم	Cd	٢٢٨٨	٠,٠٣
الكروم	Cr	٣٥٧٩	٠,٠٥
النحاس	Cu	٣٢٤٨	٠,١
الحديد	Fe	٢٤٨٣	٠,١
الرصاص	Pb	٢١٧٠	٠,٣
السليكون	Si	٢٥١٦	٣
الفضة	Ag	٣٢٨١	٠,١
الزئبق	Hg	٢٥٣٦	١٠
النيكل	Ni	٢٣٢٠	٠,١٣



رسم توضيحي للمكونات الأساسية لجهاز الامتصاص الذرى ذو الحزمتين Double beam atomic absorption

طرق تقدير العناصر في بلازما الدم باستخدام الامتصاص الذرى (عنصر الصوديوم)

هناك بعض الاحتياطات العامة التــي يجــب أن تراعــى أولا لضمان دقة القياس:

- يجب وضع عينات الدم عقب سحبها بغرض تقدير المعادن بهــا فى أنابيب مــن البــولى بــروبيلين Polypropylene tubes ذات غطاء من البولى ثين Polythene cap وذلك لتقليل التلوث الـــى أقصى حد ممكن، حيث أن أغطية المطاط Rubber تعد مصدرا غنيا بالعديد من المعدن مثل الزنك والنحاس الخ.
- جميع الأدوات الزجاجية التى تستخدم فى القياس سواء لتحــضير المنحنى القياسى أو العينة يجب نقعهــا لمــدة ٢٤ ســاعة فــى الحامض مثل حامض النتريك بتركيز ٠,١ مول/لتر أو حــامض الأيدروكلوريك ٦ مول/لتر، ثم يجرى غسيلها بعــد ذلــك فــى محلــول مــن مــادة ايثلــين داى أمينــو تتــرا أســيتك أســد Ethylenediaminotetraacetic acid (EDTA) .

أولا: طريقة المنحنى القياسي Calibration curve

١- تجهيز العينة:

- تسحب عينة الدم بحقنة من البلاستيكية لم تستخدم من قبــل ثــم توضع العينة فى أنبوبة من البــولى بــروبيلين Polypropylene tubes ذات غطاء من البولى ثين Polythene cap ثــم يجــرى

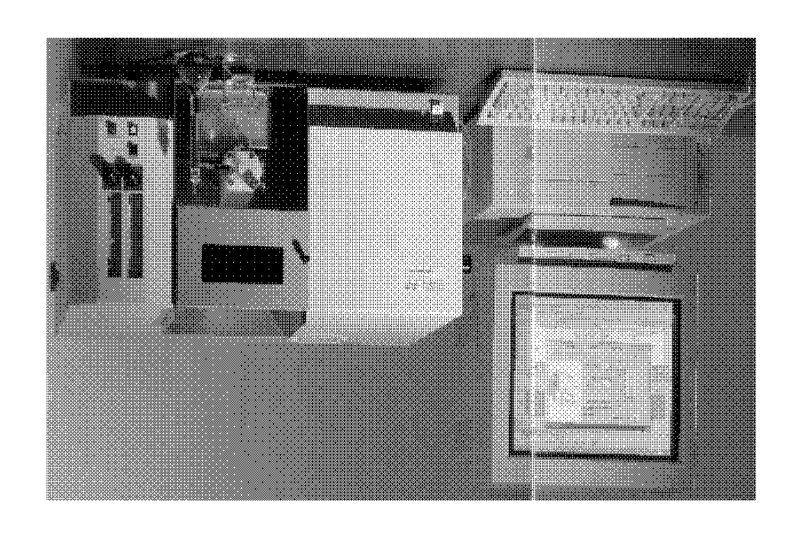
فصل البلازما.

- تخفف العينة عشرة مرات بالماء المقطر (١ حجم عينة : ٩ حجم حجم ماء مقطر) وبالتالي تصبح العينة جاهزة للقياس.

٢- تجهيز المنحنى القياسي Calibration curve

- يحضر محلول الصوديوم القياسى الأصلى Stock solution بوزن ٠,١١ جرام من ملح الصوديوم القياسى والمصنع خصيصا للقياس على أجهزة الإمتصاص الذرى (BDH Chemicals) فى دورق معياري ١٠٠ مل ثم يكمل الحجم حتى العلامة باستخدام الماء المقطر ليكون تركيز الصوديوم النهائي بالمحلول (١٠٠ ملليمول/لتر).

- ترقم خمسة دوارق معيارية سعة ١٠٠ مل نظيفة جافة وتستخدم في تحضير المحاليل قياسية بتخفيف محلول الصوديوم القياسي الأصلي بالماء المقطر على النحو التالي:



جهاز الامتصاص الذرى Atomic absorption

رقم المحلول	الكمية المضافة من محلول الصوديوم القياسي الأصلي (مل)	الكمية المضافة من الماء المقطر (مل)	تركيز الصوديوم في المحلول الناتج (ملليمول/لتر)	الامتصاص الضوئي
١	٢٠	٨٠	٢٠	
٢	٤٠	٦٠	٤٠	
٣	٦٠	٤٠	٦٠	
٤	٨٠	٢٠	٨٠	
٥	١٠٠	---	١٠٠	

- يقاس الامتصاص الذرى للمحاليل السابقة مع استخدام المحلول البلانك (الماء المقطر) لضبط الجهاز على التدريج صفر، عند ظروف التشغيل التالية:

الطول الموجي	:	٥٨٩٠ أنجستروم
لمبة الكاثود	:	لمبة الصوديوم
المادة المستخدمة كوقود	:	أسيتلين
المادة المؤكسدة	:	أكسجين
درجة حرارة الاحتراق	:	٣٠٩٠ درجة مئوية

- يرسم المنحنى القياسي الذي يوضح العلاقة بين الامتصاص الذرى لكل محلول (على المحور الصادي) وتركيز محاليل الصوديوم ملليمول/لتر (على المحور السيني) على ورقة رسم بياني.

٣- قياس الصوديوم فى عينة البلازما:

يقاس الامتصاص الذرى لمحلول العينة عند نفس ظروف التشغيل السابقة ويستنتج من المنحنى القياسي تركيز الصوديوم للعينة وذلك بمعلومية مقدار الامتصاص مع الأخذ فى الاعتبار ضرب الرقم الناتج في معامل تخفيف العينة.

ثانيا: طريقة الإضافة القياسية Standard addition

تستخدم هذه الطريق للتغلب على التداخلات التحليلية Analytical interference's التي تحدث أثناء التحليل باستخدام جهاز الامتصاص الذرى وتؤدى إلى حدوث خطأ كبير في النتائج والتى تشمل:

- **التداخل مع مادة الترابط Matrix interference** نتيجة اختلاف الخواص الطبيعية مثل التوتر السطحي واللزوجة لمحلول مادة العينة عن محلول المادة القياسية وما يستتبعه ذلك من اختلاف فى معامل تحويل كلا المحلولين إلى رذاذ بداخل الرذاذ Atomizer.
- **التداخل الكيميائي Chemical interference** ويقصد به التداخل الذي يتم أثناء تحويل المركبات التي توجد بداخل العينة من الصورة الجزيئية إلى الصورة الذرية الغازية.
- **التداخل الناتج عن التأين Ionization interference** ويقصد به التداخل الناتج عن عدم ضبط ظروف تشغيل وحدة الاحتراق فيما يتعلق بارتفاع درجة حرارة اللهب بدرجة كبيرة قد تؤدى إلى إثارة الذرات الحرة والمتعادلة فوق اللهب والتى بتعرضها

إلى كمية أخرى من الطاقة الحرارية فإن بعض إلكتروناتها قد تزال كلية وتتكون الأيونات، مما يعطى انخفاض في عدد الذرات التي توجد على حالتها الطبيعية وانخفاض الامتصاص الذرى تبعا لذلك.

- **التداخل الطيفي Spectral interference** ويعرف أيضا بالامتصاص الخلفي Background absorption والذي ينتج عن عدم تحول بعض المركبات أثناء مرحلة الاحتراق بصورة كاملة إلى ذرات، مما يؤدى إلى امتصاص هذه الجزيئات للأشعة عند مدى واسع من الأطوال الموجيه، والتى تتداخل مع الامتصاص الذرى محدثة ما يعرف بالامتصاص الخلفي.

خطوات العمل:

١- تجهز عينة الدم على النحو التالي: تسحب عينة الدم بحقنة من البلاستيكية لم تستخدم من قبل ثم توضع العينة في أنبوبة من البولى بروبيلين Polypropylene tubes ذات غطاء من البولى ثين Polythene cap ثم يجرى فصل البلازما. تخفف العينة عشرة مرات بالماء المقطر (١ حجم عينة : ٩ حجم ماء مقطر) وبالتالي تصبح العينة جاهزة للقياس.

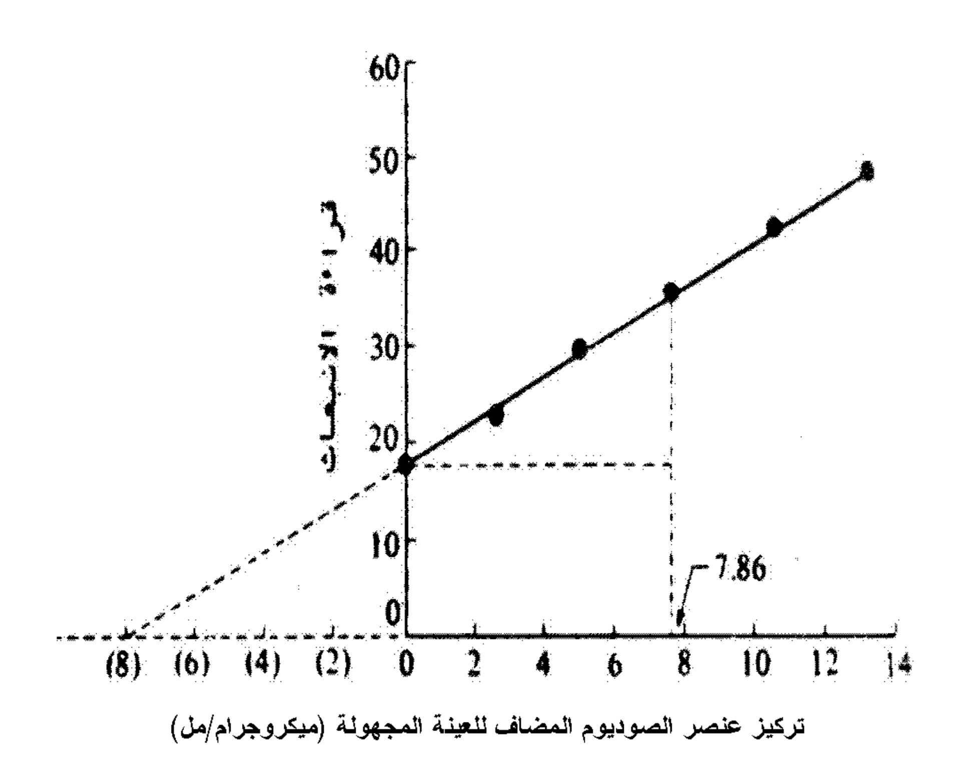
٢- يقاس الامتصاص الذرى لمحلول العينة مع استخدام المحلول البلانك (الماء المقطر) لضبط الجهاز على التدريج صفر، عند ظروف التشغيل التالية:

الطول الموجى	:	٥٨٩٠ أنجسترم
لمبة الكاثود	:	لمبة الصوديوم
المادة المستخدمة كوقود	:	أسيتلين
المادة المؤكسدة	:	أكسجين
درجة حرارة الإحتراق	:	٣٠٩٠ درجة مئوية

٣- يضاف الى أنبوبة العينة تركيزات مختلفة من المادة القياسية لمحلول الصوديوم بالتتابع وليكن ٢٠، ٤٠، ٦٠ ، ٨٠ ، ١٠٠ ملليمول/لتر، ويقاس الامتصاص الذرى لمخلوط العينة المضاف إليها المادة القياسية في كل حالة.

٤- يرسم المنحنى القياسي الذي يوضح العلاقة بين الامتصاص الذرى في كل حالة (على المحور الصادي) وتركيز الصوديوم المضاف إلى العينة بالملليمول/لتر (على المحور السيني) على ورقة رسم بياني، والذي ينتج عنه علاقة خطية Linear equation.

٥- يتم مد الخط المستقيم الناتج ليقابل المحور السيني المعبر عن التركيز في الجهة المقابلة، حيث تكون نقطة التقاطع هي بمثابة تركيز الصوديوم في عينة بلازما الدم معبرا عنها بالملليمول/لتر مع الأخذ فى الاعتبار ضرب الرقم الناتج في معامل تخفيف العينة كما هو موضح بالشكل



طريقة تقدير تركيز الصوديوم بالامتصاص الذرى باستخدام الإضافة القياسية

الباب العاشر

التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء

High performance liquid chromatography (HPLC)

التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء
High performance liquid chromatography (HPLC)

مقدمة:

يعتبر التحليل الكروماتوجرافى الـسائلي عـالي الأداء (HPLC) أحد الطرق الأساسية والهامة لتحليل المركبات الحيوية المختلفة، كمـا يعد توافر مثل هذه الأجهزة سمة مميزة للمعامل الحديثة والمتطـورة. وكباقي طرق التحليل الكروماتوجرافى الأخرى فإن التحليل باسـتخدام الـ HPLC يمتاز بالدقة والحساسية والكفاءة العالية جدا في الفـصل ، هذا علاوة على أن مدى استخداماته في الفصل لا يعتمد على تطـاير العينة Volatilization أو تأثرها بالحرارة كما هو الحال فـي أجهـزة التحليل الكروماتوجرافى الغازي Gas chromatography .

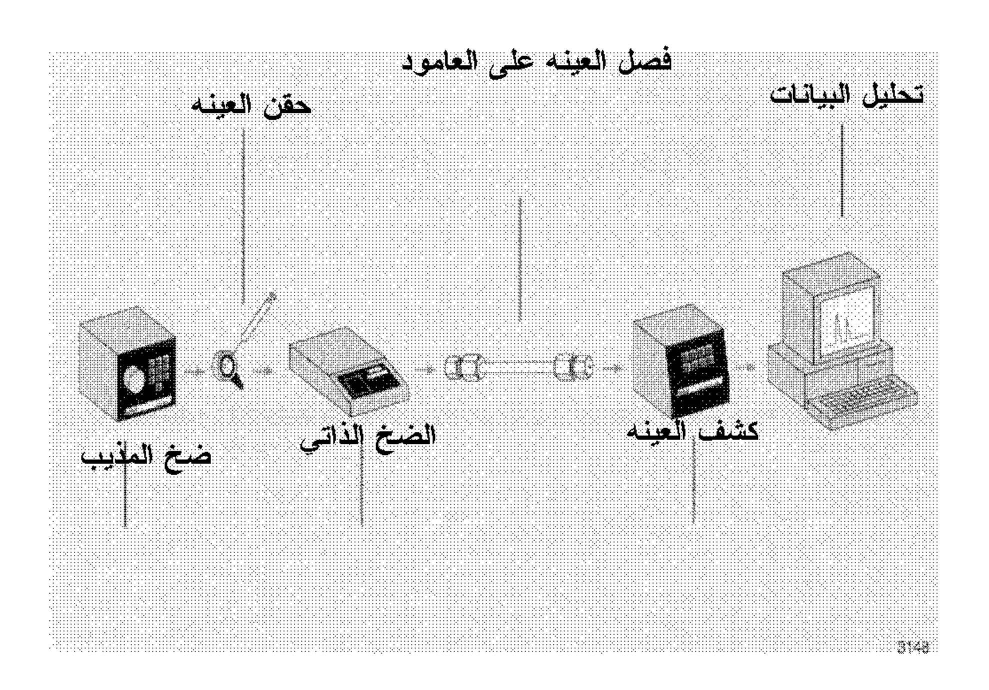
نظرية الفصل:

تبنى نظرية الفـصل وتقـدير المكونـات باسـتخدام التحليـل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء (HPLC) على توزيع العينة مـا بين طورين أحدهما متحرك سائل Mobile phase والآخر ثابت سائل أو صلب Stationary phase ، حيث يوجد الطور الثابت فى عمود من الحديد الغير قابل للصدأ (يتراوح طولة ما بين ١٠٠-٢٥٠ مم وقطرة الداخلي ٤ مم) على صورة حبيبات دقيقة ذات أقطار صـغيرة جـدا تصل الى ١٥ ميكرومتر، حيث يلاحظ أن خفض قطر الحبيبات يؤدى إلى تحسين في أداء العمود، مما يحتم رفـع الـضغط عـن طريـق مضخات عالية الكفاءة (٣٠-٥٠ ضغط جوى) للحصول على معـدل سريان مناسب للطور المتحـرك بـداخل العمـود يـصل الـى ١٠

ملليلتر/دقيقة، ولذلك يعبر عن هذه الأجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائلي ذو الضغط العالي HPLC . يتم حقن العينة يدويا أو أتوماتيكيا ليحملها الطور المتحرك إلى داخل عمود الفصل ثم تمر المكونات المفصولة من العينة خلال الكشافات المناسبة Detectors حيث يحدث كل مكون أثناء مروره خلال الكشاف تغيرا في الإشارات الكهربية التي يتم تسجيلها لتعطى كرماتوجرام الفصل.

يتم التعرف على المكونات الموجودة بالكروماتوجرام وتقديرها عن طريق مقارنة الوقت الذي يأخذه كل مركب من المركبات المفصولة ليمر خلال العمود Retention time بالأرقام الخاصة بالمواد القياسية لنفس المركبات، حيث أن الوقت التي يستغرقه المركب للمرور خلال العمود يكون ثابتا تحت ظروف التشغيل الموحدة وبالتالي يتم تحليل المركبات وصفيا.

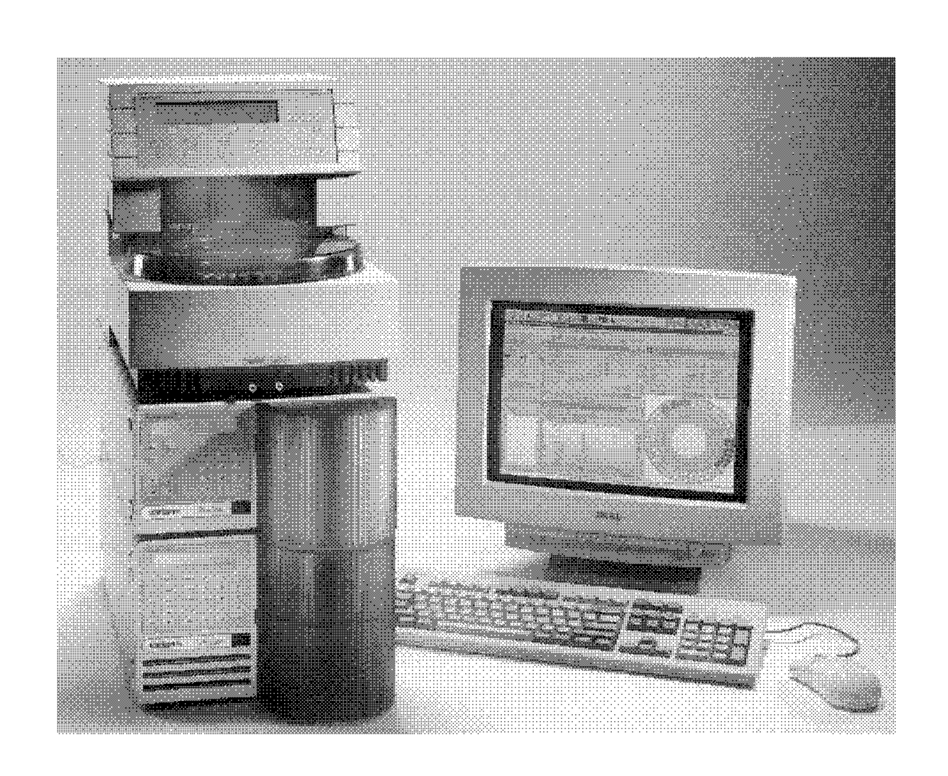
تقدير مساحة القمة Peak الخاصة بكل مركب مفصول على الكروماتوجرام والتى تتناسب طرديا مع تركيز المكون في العينة وبمقارنتها بالمساحة الخاصة للمادة القياسية لنفس المركبات نستطيع تقدير هذا المركب كميا.



مراحل تحليل العينه على جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء (HPLC)

جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء:

يتكون جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء بصفة عامة من الأجزاء الأساسية التالية:



جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء

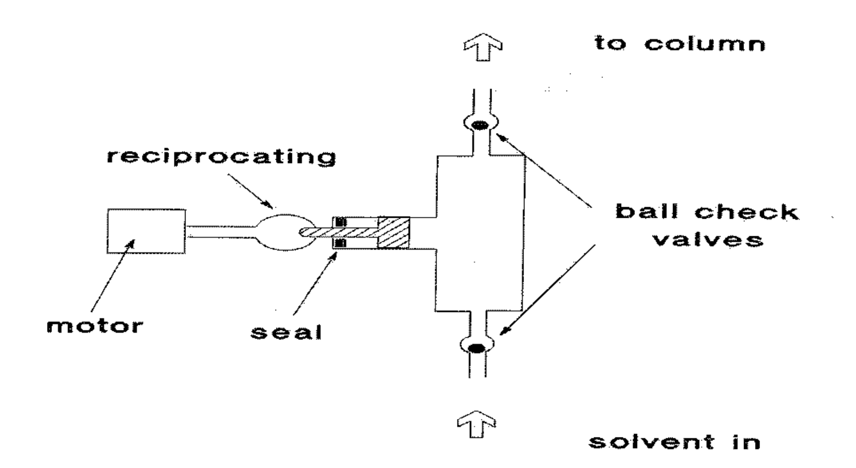
١ – المضخة Pump :

تقوم بتوفير الضغط العالي نسبيا لتعطى معدل سريان مناسب للطور المتحرك بداخل عمود الفصل يصل إلى ١٠ ملليلتر/دقيقة. فمثلا.. إذا كان عمود الفصل ذو أبعاد ٢٥٠ × ٤٠ مم وعبأ بجزيئات الطور الثابت التي قطرها ١٥ ميكروميتر فإنه يتطلب حوالي ٣٠ ضغط جوى للحصول على معدل سريان مقداره ١ مل/دقيقة من الهكسان وأكثر من ذلك ٥٠ ضغط جوى للحصول على معدل سريان مشابه للمذيبات الأكثر لزوجة مثل الماء. ويجب أن تكون النبضات Pulsation (معدل السريان/الضغط) الناتجة عن المضخة أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الكشافات يتناسب عكسيا مع النبضات. ولقد أمكن حديثا التغلب على هذه المشكلة باستخدام مضخة ذات مكبسين Dual pistons بحيث يكون دائما أحد المكبسين في مرحلة الضخ Compression والآخر في مرحلة الملأ Refilling.

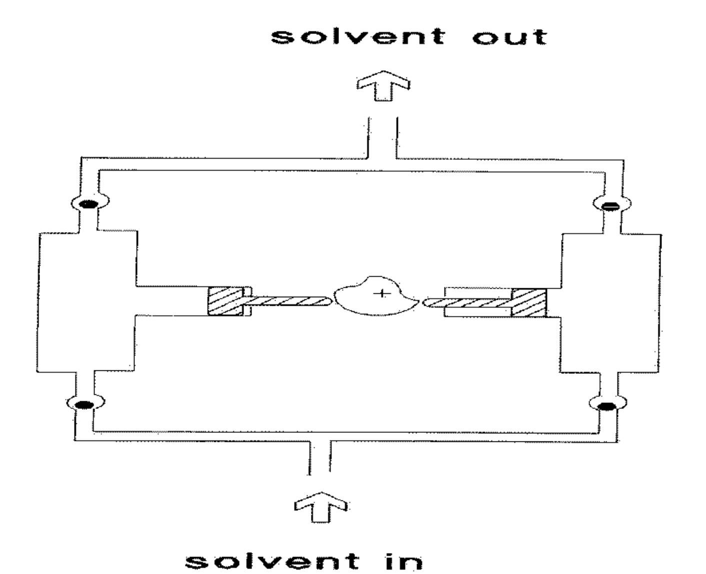
٢ – وحدة الخلط وإزالة الغازات Degasser :

تتلخص أنظمة الاستخلاص التي تتم في التطبيقات المتعلقة بالتحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء في الآتي:

- **الاستخلاص الثابت Isocratic elution** .. وفى هذا النوع من الاستخلاص لا يتم تغيير تركيب الطور المتحرك منذ بداية عملية الفصل الكروماتوجرافى وحتى نهايته.



One piston pump مضخة ذات مكبس واحد



Dual pistons pump مضخة ذات مكبسين

الاستخلاص التدريجي Gradient elution .. يستلزم الأمـــر فـــي بعـــض التطبيقات المتعلقة بالتحليل الكروماتوجرافى HPLC تغيير تركيب الطـــور المتحرك بطريقة محكمة، حيث يبدأ الاستخلاص باستخدام طور متحـــرك معين واحد ثم يضاف إليه تدريجيا كميات متزايدة من المذيب الثاني أثنـــاء التحليل، وقد يصل الأمر إلى إضافة أربعة مـــذيبات فـــي وقـــت واحـــد أو بطريقة تدريجية إلى الطور المتحرك أثناء التحليل. كذلك فقد تتم الإضـــافة للمذيبات إلى الطور المتحرك بطريقة خطية (زيادة إضافة المـــذيبات إلـــى الطور المتحرك مع زيادة الوقت) أو بطرق أخرى غير خطية. هـــذا ويـــتم إحداث النظام التدريجي في الاستخلاص باستخدام وحـــدة الخلـــط وإزالـــة الغازات Degasser والتى تتكون من مضخة لها مكبس ذو حركـــة ترددیـــة Reciprocating piston pump تقوم بخلط المـــذيبات بعـــد خروجهـــا مـــن المضخة وإزالة فقاعات الغازات التي قد تنجم عن الخلط والتى تؤثر تـــأثيرا بالغا على خط سير وكفاءة الفصل .

٣- حقن العينة Sampling:

تحقن العينة داخل عمود الفصل الخاص بجهاز HPLC بإحـــدى الطرق التالية:

- **الحقن اليدوي** .. ويتم فيه حقن العينة بداخل العمـــود بواســـطة محاقن Syringes مخصصة لهذا الغرض ذات أحجـــام مختلفـــة تتراوح بين ١٠ – ١٠٠ ميكروليتر ويكون لها القدرة على الحقن عند الضغط العالي وبحجوم مضبوطة Reproducible .
- **الحقن الأتوماتيكي** .. نظرا لما يتطلبه استخدام المحاقن اليدويـــة من مهارة خاصة قد لا تتوافر في الشخص القائم بالتحليل، هـــذا

إضافة إلى العديد من المشاكل والأخطاء التي قد تنجم عن استخدام هذا النوع من الحقن فقد أمكن التغلب على ذلك باستخدام وحدة الحقن الأتوماتيكي Autosampler والتى تسع لأكثر من ١٠٠ عينة يتم حقنها بالتتابع وبالحجم المطلوب ودون تدخل الشخص القائم بالتحليل.

٤ – عمود الفصل Column:

تختلف الأعمدة التي تستخدم في الفصل بالـ HPLC في أبعادها ومحتوى لطور الثابت بها على حسب طبيعة المركبات المطلوب فصلها، حيث يتراوح طول هذه الأعمدة ١٠٠ – ٣٠٠ مم وأقطارها الداخلية حوالي ٤٠ مم،. وعادة تصنع هذه الأعمدة من الحديد الغير قابل للصدأ Stainless steel ليتحمل الضغط العالي للطور المتحرك بداخلة. وغالبا ما يتم استخدام الأعمدة في الفصل على درجة حرارة الغرفة ولكن في بعض التطبيقات الخاصة كما هو الحال عند فصل السكريات فإن ذلك يتطلب أن تكون درجة حرارة العمود مرتفعة تتراوح بين ٦٠–٨٠ درجة مئوية مما يتطلب توافر وحدة التسخين للعمود **Column heater** والذي يتم من خلاله تسخين العمود بمرور الماء الساخن خلال جاكيت Jacket يمتد على طول العمود. ونظرا لارتفاع ثمن الأعمدة التي تستخدم في الفصل بالـ HPLC فإنه يستخدم **عمود أولى Pre-column** يحتوى على أقراص مسامية Discs ويوضع عند بداية العمود بهدف منع مرور أي شوائب صلبة بالعينة إلى داخل العمود وتؤدى إلى حدوث مشاكل عدة منها انسداد العمود وتلف طبقاته.

Mobile Phase →

Stationary Phase

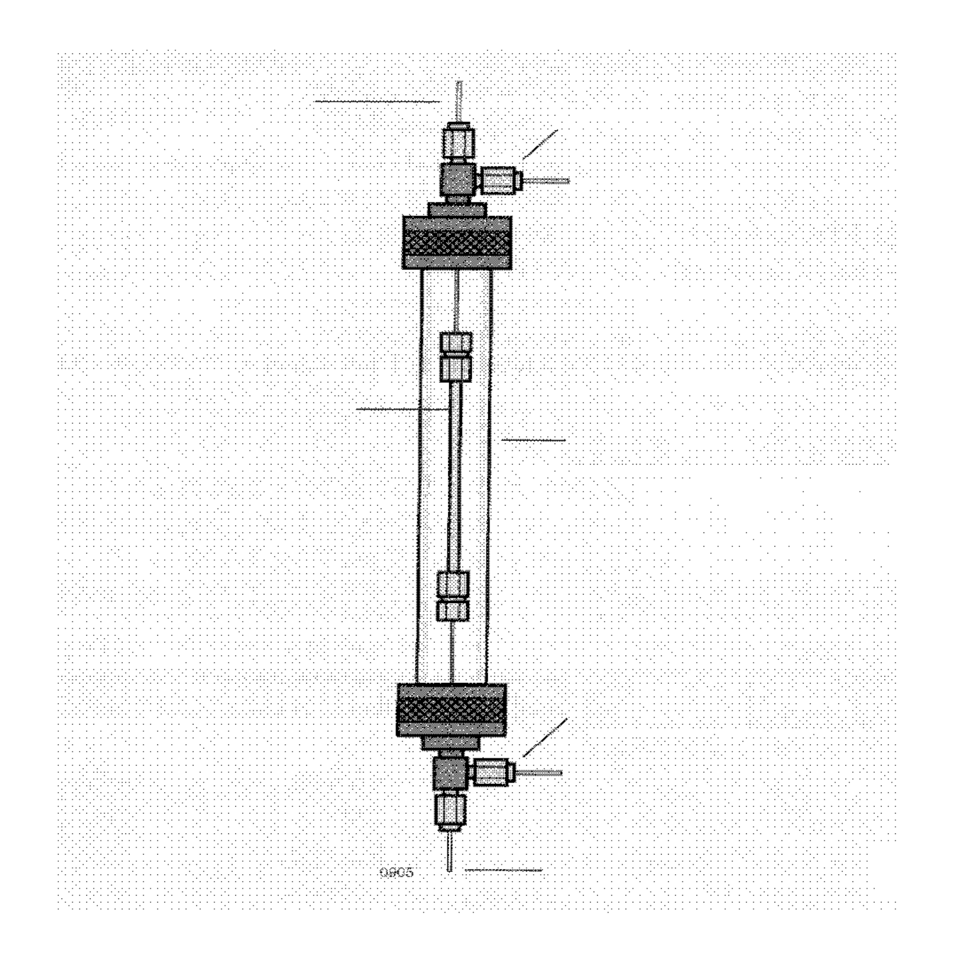
Solid Support

$$\text{Partition Coefficient} = K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s is the concentration of solute in stationary phase

C_m is the concentration of solute in mobile phase

أطوار الفصل المختلفة داخل عامود الكروماتوجرافى
(الطور المتحرك – الطور الثابت – الدعامة)



سخان العمود Column heater
لجهاز التحليل الكروماتوجرافى HPLC

٥- الكشافات Detectors:

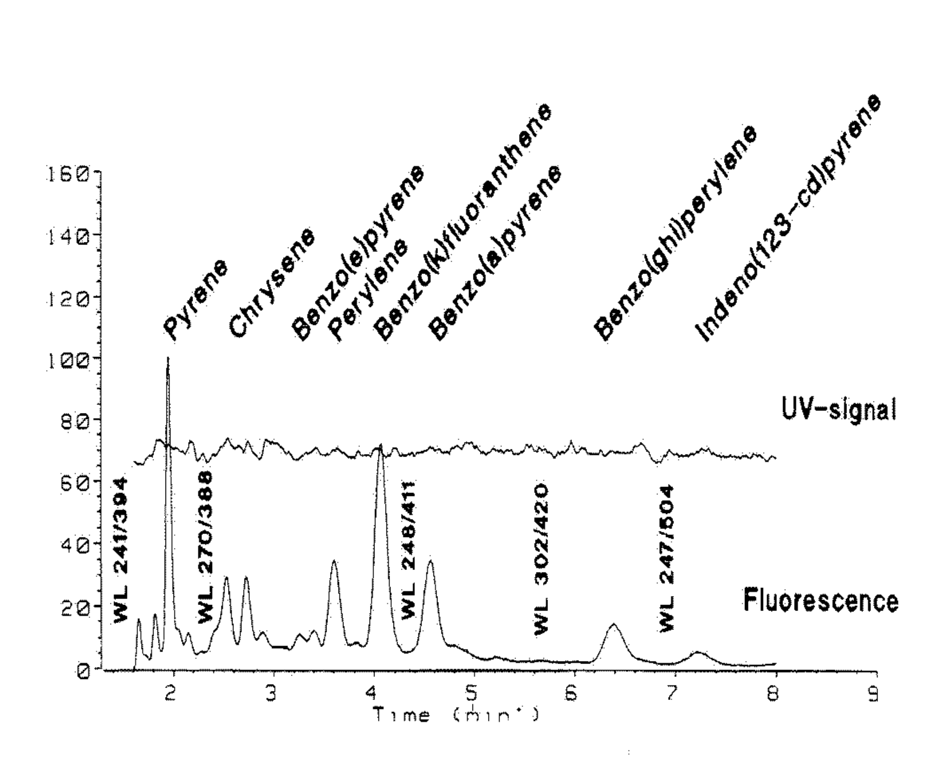
تختلف أنواع الكشافات التي تلحق بجهاز الـ HPLC تبعا لنوع التطبيقات المطلوب إجراؤها. ورغم كثرة عدد الكشافات المستخدمة في هذا النوع من التحليل إلا أنها تقع تحت مجموعتين أساسيتين هما:

١- كشافات تعتمد على خصائص الطور المتحرك مثل التوصيل الكهربي Conductivity أو معامل الانكسار Refractive index ، وبالرغم من انخفاض حساسية هذه الكشافات فإنها تكشف غالبا عن كل مكونات العينة ويمثلها:

- كشاف قياس التوصيل الكهربي Electrochemical detector
- كشاف قياس معامل الانكسار Refractive index detector

٢- كشافات تعتمد على تقدير بعض الخصائص المعينة لمكونات العينة مثل الامتصاص عند أطوال موجية معينة، وتمتاز هذه الكشافات بدرجة الحساسية العالية ويمثلها:

- كشاف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية
Ultraviolet absorbance detector
- كشاف امتصاص الأشعة الفلوريسنس
Fluorescence absorbance detector



PAH's extracted from soil; Col.: Sup.LC-PAH 150x4.6mm;
Solv.: $H2O/CH3OH$= 10:90

مميزات استخدام كشاف الأشعة الفلوريسينس مقارنة بكشاف الأشعة فوق البنفسجية عند القياس على جهاز الــ HPLC

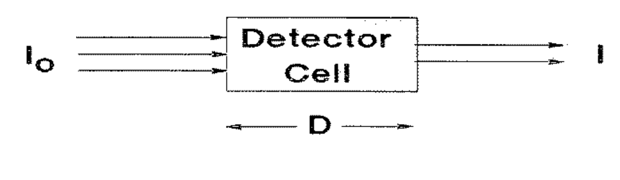
كشاف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية

detector Ultraviolet absorbance

يعد هذا الكشاف من أكثر أنواع الكشافات شيوعا في التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء ، والتى تبنى نظرية عملة على اختلاف قدرة العديد من المركبات العضوية والحيوية على امتصاص الإشعاعات المكونة لمنطقة الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet spectrum، حيث أن المركبات التي تحتوى على روابط مشبعة saturated bonds تمتص كمية قليلة من أشعة الـ UV إذا ما قورنت بالمركبات الغير مشبعة Unsaturated bonds. ففي حالة المركبات التي تحتوى على رابطة زوجية واحدة يكون الامتصاص في المنطقة فوق البنفسجية ضعيف حيث يظهر أقصى امتصاص عند طول موجي ١٩٠ – ٢٠٠ نانوميتر. أما بالنسبة للمركبات التي تحتوى على روابط غير مشبعة متبادلة Conjugated unsaturated bonds فإنها تمتص مقدار كبير من الأشعة ويظهر أقصى امتصاص لها عند أطوال موجية أطول. ويطلق على المجموعة الفعالة فى الجزيء الحيوي التي تسبب الامتصاص الضوئي في منطقة الأشعة فوق البنفسجية اسم المجموعة الكروموفورية Chromophores. ولقد لوحظ أن هناك مجاميع كيميائية في الجزيء لا تمتص فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية بالرغم من قدرتها فى التاثير على الطيف Spectrum الخاص بالمركب عن طريق انتقال أقصى امتصاص Maximum absorption أو زيادة أو خفض قيمة الامتصاص. وبصفة عامة فإن المجاميع الكيميائية غير القطبية مثل الألكيلات يكون لها تأثير صغير على الطيف على عكس المجاميع القطبية مثل الأمين والنترو الخ فإنها تستطيع أن تحدث تغيرا جوهريا في الطيف الخاص بالمركب. ويحكم

الامتصاص في منطقة الأشعة فوق البنفسجية قــانون بيــر-لآمبــرت Beer-Lambert والذي سبق الحديث عنه باستفاضة من قبل.

The fraction of light transmitted through the cell is related to the solute concentration by BEER'S LAW.



$$\log \frac{I_o}{I} = A = \varepsilon_\lambda . C . D$$

I_o = Incident light intensity
I = Transmitted light intensity
A = Absorbance
ε_λ = Molar absorptivity at wavelength λ
C = Molar solute concentration (mol/litre)
D = Cell path length (cm)

نظرية العمل لكشاف الأشعة فوق البنفسجية لجهاز الـــ HPLC

٦- وحدة معالجة النتائج Data processing:

وتتكون من جهاز كمبيوتر شخصي PC- computer محمل عليه البرامج الخاصة بالتشغيل والتى يتم من خلالها:

- ضبط جميع ظروف التشغيل الخاصة بالوحدات المكونة للنظام والتى تشمل المضخة ووحدة الحقن الأتوماتيكي والكشافات.
- اختيار البرنامج المناسب للفصل والذي يشمل نظام خلط المذيبات المكونة للطور المتحرك ومعدل السريان ونوع العمود ونوع الكشاف والطول الموجي الذي سيتم عنده الكشف.
- متابعة سير الفصل لمكونات العينة المختلفة من خلال مشاهدة الكروماتوجرام أولا بأول على شاشة الكمبيوتر.
- إجراء كافة الحسابات اللازمة على الكروماتوجرام الناتج لتحليل مكونات العينة وصفيا وكميا.

الاحتياطات العامة التي يجب مراعاتها عند العمل على أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء:

١- **المذيبات:** يراعى أن تكون المذيبات على درجة عالية من النقـاء حتى لا تؤدى إلى حدوث انسداد بعمود الفصل، كذلك يجـب أن تذوب فيها العينة المراد فصلها، منخفـضة اللزوجـة. ويمكـن إجراء التنقية للمذيبات المستخدمة فى الـــ HPLC باسـتخدام وحدات الترشـيح Holder unit ذات الفلاتـر(٠,٢٢ – ٠,٤٥ ميكرون) والموضحة بالرسم.

٢- **تخلص الطور المتحرك من الهواء:** يـذوب الهـواء فـى كـل المذيبات المستخدمة كطور متحرك في جهـاز الـــ HPLC ، ومع ذلك فغن درجة ذوبان الهواء تختلف اختلافا كبيرا باختلاف نوع المذيب، فالمذيبات القطبية وبصفة خاصة الماء لها درجـة ذوبان عالية، بينما المذيبات الغير قطبية مثل الهكسان يكون لهـا درجة ذوبان منخفضة. ويؤدى الهـواء المـذاب فـى الطـور المتحرك الى مشاكل كثيرة منها:

- تقليل كفاءة صمامات المضخة
- تكون فقاعات فى الخلية Flow cell عند استخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية.
- عدم ثبات خط الأساس Base line.

لذلك أوجب الأمر التخلص مـن الهـواء الموجـود بالمـذيبات قبـل الإستخدام، ويتم ذلك بعدة طرق منها:

- غليان المذيب تحت مكثف عاكس ثم التبريد قبل الاستخدام.
- استخدام التفريغ.
- امرار غاز الهيليوم خلال المذيب حيث يحل الهيليوم محل الهواء الذي له درجة ذوبان منخفضة جدا.
- استخدام جهاز الصعق الصوتي Ultrasonic لطرد الهواء.

تقدير الأحماض الدهنية في العينات البيولوجية باستخدام التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء

Fatty acids determination in biological fluids by using of HPLC

يتم تقدير الأحماض الدهنية في العينات البيولوجية (مهـــروس الأنسجة – السيرم) بواسطة التحليل الكروماتوجرافى الـــسائلي عـــالي الأداء HPLC لإسترات الميثايل أو البيوتايل للأحماض الدهنيـــة فـــي الدهن المستخلص.

أولا: طرق تجهيز استرات الأحماض الدهنيـــة Fatty acids esters preparation

أ- أسترة الأحماض الدهنية (استر الميثايل) بواســـطة ميثوأكـــسيد الصوديوم

الأساس العلمي:

يتم تجهيز استرات الميثايل للأحماض الدهنية مباشـــرة بمعاملـــة دهن مهروس الأنسجة أو السيرم بمادة ميثوأكسيد الصوديوم Sodium methoxide ثم التقدير باستخدام الكروماتوجرافى الغازي للأحمـــاض الدهنية.

الأدوات المستخدمة:

- زجاجات صغيرة بغطاء قلاووظ small screw-capped vials

المحاليل اللازمة:

- اتير بترولي (٤٠ – ٦٠)
- محلول ميثوأكسيد الصوديوم ١ مولر (يزاب ١,١٥ جرام صوديوم فى ٥٠ مل كحول ميثيلى)

طريقة العمل:

١- يؤخذ وزنة معينة من عينة دهن الأنسجة أو حجم معين من عينة دهن السيرم في زجاجة صغيرة بغطاء قلاووظ small screw-capped vial ثم يضاف ٣ مل أثير بترولي ثم تغطى الزجاجة وترج حتى يذاب الدهن.

٢- يضاف ١٥٠ ميكروليتر من محلول ايثوأكسيد الصوديوم ثم تغطى الزجاجة وترج لبضع ثواني حيث يصبح المحلول عكرا بعد أن كان رائقا لترسيب جليسريدات الصوديوم.

٣- يترك المحلول ساكنا ٥ دقائق ثم يصبح بعدها جاهزا للحقن في جهاز الكروماتوجرافى الغازي لتقدير الأحماض الدهنية الموجودة بالعينة.

ب- أسترة الأحماض الدهنية (استر الميثايل أو البيوتايل) بواسطة البوتاسا الكاوية الكحولية

الأساس العلمي:

يتم تجهيز استرات الميثايل أو البيوتايل للأحماض الدهنية مباشرة بمعاملة دهن الأنسجة أو السيرم بمادة البوتاسا الكاوية الميثانولية (للحصول على استرات الميثايل) أو بالبوتاسا الكاوية البيوتانولية (للحصول على استرات البيوتانول) ثم التقدير باستخدام

الكروماتوجرافى الغازي للأحماض الدهنية.

الأدوات المستخدمة:

- زجاجات صغيرة بغطاء قلاوظ small screw-capped vials
- دوارق مخروطية ١٠٠ مل
- جهاز طرد مركزى

المحاليل اللازمة:

- هكسان
- محلول البوتاسا الكاوية الميثانولية ٣ مولر
- محلول البوتاسا الكاوية البيوتانولية ٣ مولر
- محلول كلوريد الصوديوم المشبع

طريقة العمل:

١- يحضر تقريبا ٢٥ مل من محلول عينة الزيت أو الدهن في الهكسان ١٠ % ثم يؤخذ ١٩ مل من هذا المحلول في دورق.

٢- يضاف إلى محتويات الدورق ١,٢٥ مل من البوتاسا الكاوية الميثانولية أو البيتانولية ٣ مولر ثم الرج على هزاز لمدة ٣٠ دقيقة.

٣- تنقل محتويات الدورق إلى أنابيب طرد مركزي كبيرة الحجم تحتوى على ١٠ مل محلول كلوريد الصوديوم المشبع، ثم يغسل

الدورق عدة مرات بواسطة الماء المقطر وينقل ناتج الغسيل إلى أنابيب الطرد المركزي (حيث يؤدى استخدام الماء في عمليات الغسيل إلي تقليل ظهور القمم الكروماتوجرافية الخاصة بكحول الميثانول أو البيوتانول إلى أقل حد ممكن).

٤- ترج محتويات الأنابيب ثم يجرى لها الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق على سرعة ٣٠٠٠ لفة/دقيقة ، حيث تطفو طبقة الهكسان على السطح والتى تحتوى على الإسترات.

٥- تنقل طبقة الهكسان الى زجاجات صغيرة بغطاء قلاووظ small screw-capped vials وتكون جاهزة لإجراء الاشتقاق derivatization عليها.

ثانيا: اشتقاق الأحماض الدهنية Fatty acids derivatization

تجرى عملية اشتقاق Derivatization للأحماض الدهنية مع أحد الكروموفورات التي تناسب العمل على كشاف الأشعة فوق البنفسجية UV-chromophores مثل بارا-بروموفينايل أسيل بروميد *p*-Bromophenylacyl bromide (وفق المعادلة الموضحة بالشكل التالي)، حيث يؤخذ ١ مل من مستخلص الأحماض الدهنية العضوي فى أنبوبة اختبار ويضاف إليها ١ مل من محلول بارا-بروموفينايل أسيل بروميد *p*-Bromophenylacyl bromide (٥ ملليجرام/مل) وفى وجود ايثيلات الإميد $N(Et)_3$ ثم تترك الأنبوبة على درجة ٤٠ درجة مئوية في حدود الساعة، وبعد التجفيف تحت ضغط تذاب المحتويات فى الطور المتحرك لتصبح جاهزة للحقن فى جهاز التحليل الـ HPLC.

UV-Detection

Br–C₆H₄–C(=O)–CH₂–Br + RCOOH (fatty acid)

p-Bromophenylacyl bromide

↓ $N(Et_3)$

increased yields at elevated temperatures

Br–C₆H₄–C(=O)–CH₂–O–C(=O)–R

اشتقاق Derivatization للأحماض الدهنية مع أحد الكر وموفورات التي تناسب العمل على كشاف الأشعة فوق البنفسجية UV-chromophores مثل بارا-بروموفينايل أسيل بروميد *p*-Bromophenylacyl bromide

ثالثا: تقدير الأحماض الدهنية Fatty acids composition

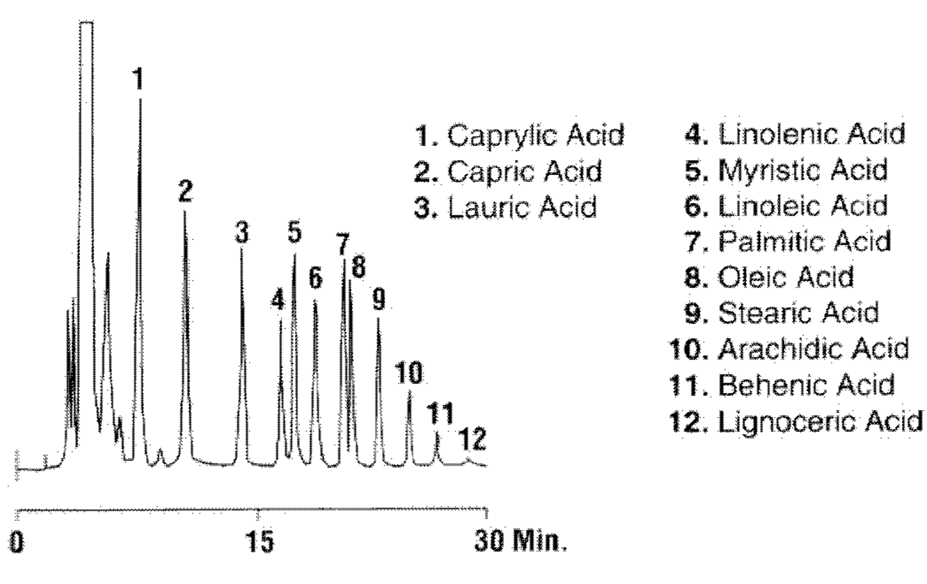
١- يـــتم تقـــدير الأحمـــاض الدهنيـــة باســـتخدام جهـــاز التحليـــل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء بحقن ٢٠ ميكروليتـــر مـــن عينة الأحماض الدهنية السابق اشـــتقاقها derivatized fatty acids في الجهاز الذي تم تشغيله وفق البرنامج المخصص لهذا الغـــرض كما يلي:

العمود : Ultrasphere C٨, ٥ µm, ٢٥٠ x ٤,٦ mm
الطور المتحرك : المذيب الأول (A) الأسيتونتريل
المذيب الثاني (B) الماء
نظام الفصل :

الزمن (دقيقة)	صفر	١	١٦	٣٠
مذيب A %	٢٠	٢٠	١٠٠	١٠٠
مذيب B %	٨٠	٨٠	صفر	صفر

معدل السريان : ٠,١ مل/دقيقة
الكشاف : أشعة فوق البنفسجية عند طول مـــوجي ٢١٤ نانوميتر.

٢- يتم حساب كمية كل حامض دهني على حدة بمقارنة كروماتوجرام العينة الناتج بالكروماتوجرام القياسي للأحماض الدهنية Standard chromatogram of fatty acids كما هو موضح بالشكل التالي.



Column: Ultrasphere C8, 5µm, 250 x 4.6mm
Mobile Phase: **A:** Acetonitrile **B:** Water (80:20)
Gradient:

Time:	0	1	16	30
B%:	80	80	100	100

Flowrate: 1.0mL/min
Detector: UV at 214nm

فصل الأحماض الدهنية في العينات البيولوجية باستخدام التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء

الباب الحادي عشر

محلل الأحماض الأمينية

Amino acids analyzer

محلل الأحماض الأمينية

Amino acids analyzer

مقدمة:

يعد محلل الأحماض الأمينيـــة Amino acids analyzer أحـــد المعدات والتقنيات الهامة التـــي لا غنـــى عنهـــا المعامـــل الحديثـــة والمتطورة، والتى تمتاز بالدقة والحساسية والكفاءة العالية في فـــصل المركبات الحيوية الهامة مثـــل نـــواتج تحلـــل البروتينـــات Protein hydrolysis products والأحماض الأمينية Amino acids والأمينات الحيويـــة Biogenic amines ، جامـــا- أمينـــو حـــامض البيوتيريـــك δ-aminobutyric acid (GABA) ، والتى تلعب دورا هاما وأساســـيا في تشخيص العديد من الأمراض التي تصيب جـــسم الكـــائن الحـــي وحالته الفسيولوجية..الخ.

نظرية الفصل:

لا تختلف نظرية الفصل باستخدام جهـــاز محلـــل الأحمـــاض الأمينية Amino acids analyzer كثيرا عن ما سبق ذكرة عند الفصل باستخدام التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء HPLC، حيـــث يتم توزيع مكونات العينة المراد فصلها العينة ما بين طورين أحـــدهما متحرك سائل Mobile phase (المذيب) والآخر ثابت سائل أو صـــلب Stationary phase (عمود الفصل)، حيث يـــتم اســـتخدام مـــضخات Pumps عالية الكفاءة (٤٠٠ بار) للحصول على معدل سريان مناسب للمذيب بداخل عمود الفصل يتراوح بين ٠,٠١ - ٢ ملليلتر/دقيقة. يتم

حقن العينة يدويا أو أتوماتيكيا ليحملها المذيب إلى داخل عمود الفصل ثم تمر المكونات المفصولة الى عمود أخر يتم بداخلة تفاعل المركبات المفـصولة مـــع أحـــد الكروموفــورات الملونـــة مثـــل النـنهيـــدرين Ninhydrine أو أورثو فيثالداى ألدهيد *o*-phthaldialdehyde (OPA) والتى يتم كشفها بواسطة أحد الكشافات المتخصصة (كـــشاف الأشـــعة فوق البنفسجية أو كشاف الأشعة الفلورينسية UV or Fl detectors)، حيث يحدث كل مكون أثناء مروره خلال الكشاف تغيرا في الإشارات الكهربية التي يتم تكبيرها باســـتخدام المكبـــر Amplifier وتـــسجيلها لتعطى كرماتوجرام الفصل. ثم يتم التعرف على المكونات الموجـــودة بالكروماتوجرام وصفيا عن طريق مقارنة الوقت الـــذي يأخـــذه كـــل مركب من المركبات المفصولة ليمر خلال العمـــود Retention time بالأرقام الخاصة بالمواد القياسية لنفس المركبات، حيـــث أن الوقـــت الذي يستغرقه المركب للمرور خلال العمود يكون ثابتا تحت ظـــروف التشغيل الموحدة، ثم تقدير مساحة القمة Peak الخاصة بكل مركـــب مفصول على الكروماتوجرام والتى تتناسب طرديا مع تركيز المكـــون فى العينة وبمقارنتها بالمساحة الخاصة للمادة القياسية لنفس المركبات نستطيع تقدير هذا المركبات المفصولة كميا.

تركيب الجهاز:

يتكون جهاز محلل الأحماض الأمينية من الوحـــدات الرئيـــسة التالية:

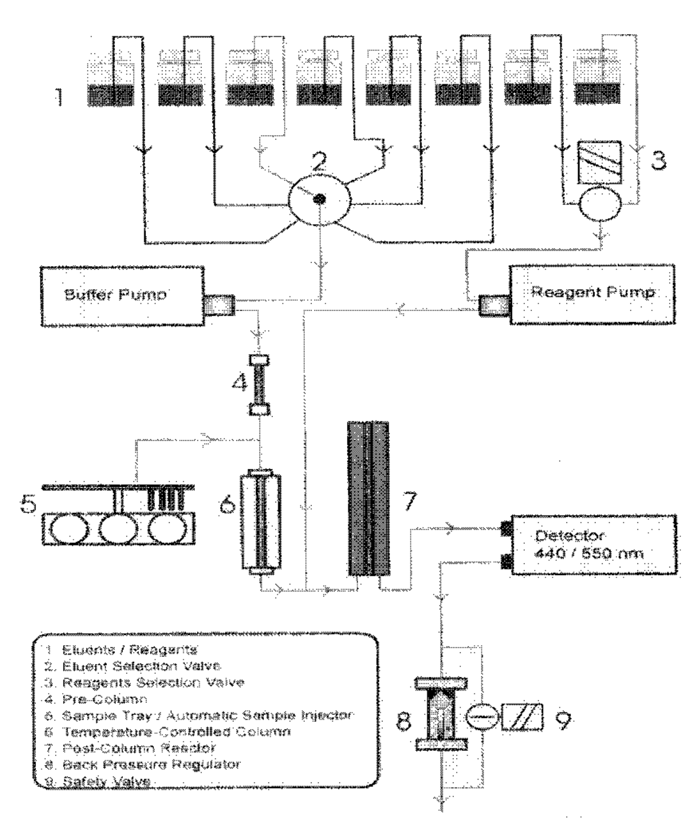
١ – مضخة المذيب Buffer pump system:

تقوم هذه المضخة بسحب المذيبات المكونة للطـــور المتحـــرك

والتى قد يصل عددها إلى ٦ مذيبات وخلطها ثم ضخها بداخل عمـــود الفصل تحت ضغط عالي نسبيا لتعطى معدل سريان مناســب للطـــور المتحرك يتراوح بين ٠,١ – ٢ ملليلتر/دقيقة. ويمكن لهذه الطلمبـــات أن تعطى ضغط عالي قد يصل إلى ٤٠ ميجـــا بـــار (٤٠٠ بـــار) . وأغلب المضخات التي يتم استخدامها فـــي هـــذا النظـــام تكـــون ذات مكبسين Dual pistons بحيث يكون دائما أحد المكبسين فـــي مرحلـــة الضخ Compression والآخر في مرحلة الملأ Refilling مما يـــؤدى إلى تقليل النبضات Pulsation (معدل السريان/الضغط) الناتجة عـــن المضخة لأقل ما يمكن، مما يؤدى إلى ثبات وزيادة كفـــاءة الكـــشافات الملحقة بالجهاز ، وبالتالي قلة النبضات بخط الأساس Base line.

٢ – وحدة العمود Column unit:

تتكون هذه الوحدة من عمود الفصل Column ووحدة الـــتحكم في درجة حـــرارة العمـــود Temperature gradient programmable والتى تقوم برفع درجة حرارة العمود حتى ٩٩ درجة مئوية مما يزيد من كفاءة الفصل. وعادة تصنع هذه الأعمدة من الحديد الغيـــر قابـــل للصدأ Stainless steel ليتحمل الضغط العالي للمذيبات بداخلة.ونظرا لارتفاع ثمن الأعمدة التي تستخدم في الفـــصل علـــى جهـــاز محلـــل الأحماض الأمينية فإنه يستخدم عمود أولى Pre-column يحتوى على أقراص مسامية Discs ويوضع عند بداية العمود لضمان عدم مـــرور أي شوائب صلبة بالعينة نتيجة عدم الاستخلاص والترشيح والنقية



رسم توضيحي لمحلل الأحماض الأمينية أوتوماتيكياً

Amino acids analyzer

١- خزانات المذيبات
٢- صمام توزيع المذيب
٣- صمام المادة الكاشفة
٤- العامود المبدئي
٥- وحدة الحقن الأوتوماتيكية

٦- وحدة العمود
٧- عمود الاشتقاق
٨- منظم الضغط الرجعى
٩- صمام الأمان

الجيدة إلى داخل العمود وتؤدى إلى حدوث مشاكل عدة منهـــا انـــسداد العمود وتلف طبقاته، كذلك يـــزود العمـــود بوحـــدة أمـــان حـــراري Overheat security device تعمل أتوماتيكيا في حالة ارتفـــاع درجـــة حرارة العمود لأكثر من المطلوب.

٣- حقن العينة Sampling :

تحقن العينة داخل عمود الفصل إما يدويا أو أتوماتيكيـــا عـــن طريق وحدة الحقن الأتومـــاتيكي Autosampler التـــي تتـــوافر الآن بأغلب الأجهزة الحديثة، ويتم عن طريقها حقـــن العينـــات بالأحجـــام المضبوطة Reproducible والتتابع المطلوب دون التدخل الشخـــصي للقائم بالتحليل. كما يتم بداخل هذه الوحدة التحكم في درجـــة حـــرارة الحقن بدءا من ٥ وحتى ٧٠ درجة مئوية على حسب نوع العينة.

٤- وحدة مفاعل بعد العمود Post column reactor unit:

تتكون هذه الوحدة من عمود Column يتم بداخله التفاعل مـــا بين المركبـــات المفـــصولة مثـــل الأحمـــاض الأمينيـــة مـــع أحـــد الكروموفورات Chromophores مثل النتهيدرين لينتج المعقد اللـــوني الذي يمكن حثه بسهولة بواسطة كشافات الأشعة فوق البنفـــسجية UV-detector. ويتم سحب الكروموفور وضخه إلى داخـــل العمـــود عـــن طريق مضخة خاصة به Reagent pump ملحقة بالنظام. كما تتم هذه التفاعلات عادة تحت درجات الحرارة المرتفعة، لـــذلك تـــزود هـــذه الوحدة بنظام تسخين يعمل بداية من درجة حرارة الغرفة وحتى ١٩٩ درجة مئوية.

٥- وحدة الخلط Eluent selection valve:

يستلزم عادة الفصل باستعمال محلل الأحماض الأمينية تغيير تركيب الطور المتحرك بطريقة مبرمجة زمنيا، حيث يبدأ الاستخلاص باستخدام مذيب واحد ثم يضاف إليه تدريجيا كميات متزايدة من مذيبات أخرى قد يصل عددها الى ٥ مذيبات في وقت واحد أثناء التحليل، وهذا ما يطلق علية الاستخلاص التدريجي Gradient elution وتقوم بتنفيذه وحدة الخلط. كذلك يتم بداخل هذه الوحدة الخلط الجيد للمذيبات المختلفة وإزالة فقاعات الغازات التي قد تتنح عن الخلط ويكون لها بالغا الأثر على خط سير وكفاءة عملية الفصل على النظام.

٦- نظام الكشف عن المركبات المفصولة Detection system:

يلحق بجهاز محلل الأحماض الأمينية عادة كشافات تعتمد على تقدير بعض الخصائص المعينة لمكونات العينة المفصولة مثل الامتصاص عند أطوال موجية معينة، والتى تتميز بدرجة الحساسية العالية ويمثلها وهى:

- كشاف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet absorbance detector (UV- detector)
- كشاف امتصاص الأشعة الفلوريسنس Fluorescence absorbance detector (Fl - detector)

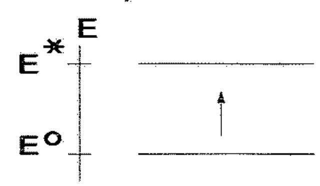
أ- كشاف قياس الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet detector

سبق الحديث عنه باستفاضة تحت باب جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلي عالي الأداء HPLC.

ب- كشاف قياس أشعة الفلورسنس Fluorescence detector

يعد هذا الكشاف من الكشافات الهامة التي يكثر استخدامها مع جهاز محلل الأحماض الأمينية، والتى تبنى نظرية عملة على أن امتصاص الجزيئات في حالتها العادية لكمية مناسبة من الطاقة يؤدى إلى انتقال إلكترون أو أكثر من مدار جزيئي ذو طاقة منخفضة إلى مدار ذو طاقة أعلى، ويتكون نتيجة لذلك الحالة المثارة للجزئ Exited state. هذا الجزئ المثار يكون غير ثابت نتيجة للطاقة المكتسبة، ويفقد طاقة الإثارة خلال فترة زمنية صغيرة جدا (جزء من الثانية) ثم يعود مرة أخرى إلى حالته العادية حيث يفقد الطاقة المكتسبة Emission في صورة إشعاعية في الجزيئات يطلق عليها الفلورسنس Fluorescence. ويتركب الكشاف كما هو موضح بالشكل من الأجزاء التالية: مصدر للأشعة Radiation source ، وحدة فصل الأطوال الموجية لأشعة المصدر Filter or monochromator ، خلية مرور العينة Flow cell ، وحدة قياس أشعة الفلورسنس Fluorescence detector ، وحدة إظهار كثافة الأشعة Recorder .

Absorption (excitation):



$E_a = E^* - E^o$

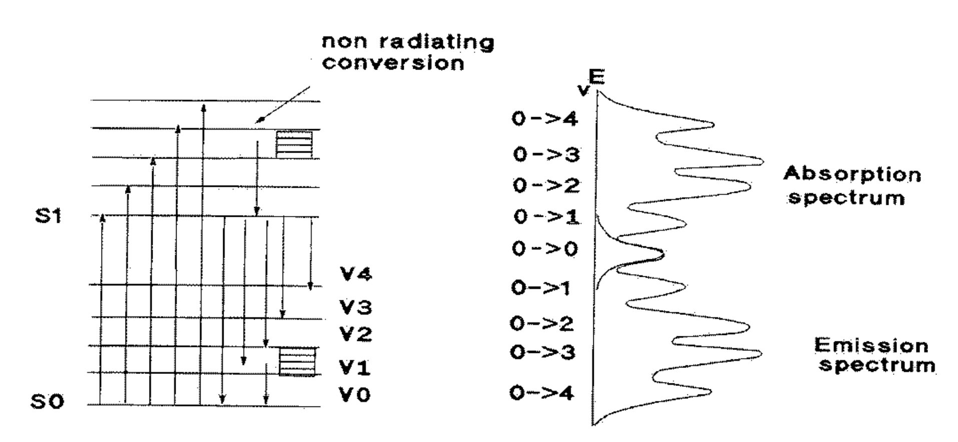
eg: light
chemical energy

Emission

E
E*
Eo

$E_e = E^* - E^o$

eg: example: heat
light



$$E_{em} = hv = \triangle E_e + \triangle E_{vib} + \triangle E_{rot}$$

نظرية عمل الكشاف الفلوريسنس لجهاز محلل الأحماض الأمينية

٧- وحدة التحكم ومعالجة النتائج:

System control and data handling system

تتكون هذه الوحدة من وحدة حاسب آلي محمـــل عليهـــا كافـــة البرامج المتعلقة بتشغيل النظام وضبط ظروف تشغيل جميع الوحدات والتى تشمل مـــضخة المـــذيب ، وحـــدة العمـــود، وحـــدة الحقـــن الأتوماتيكي، وحدة مفاعل ما بعد العمود، والكشافات. كـــذلك اختيـــار البرنامج المناسبة للفصل والذي يشمل نظام خلط المـــذيبات المكونـــة للطور المتحرك ومعدل السريان ونوع العمود ونوع الكشاف والطـــول الموجي الذي سيتم عنده الكشف. هذا إضافة إلى متابعة سير الفـــصل لمكونات العينة المختلفة من خلال مشاهدة الكروماتوجرام أولا بـــأول على شاشة الكمبيوتر. كذلك يلحق بالوحدة كافـــة البـــرامج المتعلقـــة بإجراء كافة الحسابات اللازمة على الكرومـــاتوجرام النـــاتج لتحليـــل مكونات العينة وصفيا وكميا وذلـــك بالاســـتعانة بالكروماتوجرامـــات القياسية.

تقدير الأحماض الأمينية في العينات البيولوجية باستخدام محلل الأحماض الأمينية

Amino acid determination in biological fluids by using of amino acids analyzer

مقدمة:

حتى يتسنى فصل وتقدير الأحماض الأمينية في العينات البيولوجية (مهروس الأنسجة - السيرم) بواسطة محلل الأحماض الأمينية فإن ذلك يستدعى أولا وفى أغلب الأحوال فصل مخاليط تلك الأحماض من العينات التي تحتويها عن طريق التحلل المائي الحامضى والقاعدى للبروتينات Acid and alkaline hydrolysis of proteins ، ثم حقن العينة المتحللة بداخل الجهاز الذي تم ضبط جميع الظروف الخاصة بالتشغيل مسبقا ليتم الفصل، ثم إجراء كافة الحسابات اللازمة على الكروماتوجرام الناتج لتقدير نوع وكمية الأحماض الأمينية المكونة للعينة.

أولا: التحلل المائي للبروتينات Hydrolysis of proteins

أ- التحلل المائي الحامضى للبروتينات
Acid hydrolysis of proteins

تهدف هذه التجربة إلى الحصول على مخلوط من معظم الأحماض الأمينية المكونة للبروتين ماعدا التربتوفان Tryptophane.

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب اختبار ١٠ سم تسحب على اللهب على بعد ٢ سم من

فوهتها.

- فرن كهربى
- جهاز طرد مركزى
- موقد بنزن

المحاليل اللازمة:

- محلول حامض الكبريتيك ٨ ع
- محلول كلوريد باريوم مشبع
- عينات البروتين الواقعة تحت الدراسة

طريقة العمل:

١- يوزن ٠,١ جرام من البروتين المراد تحللة فى أنبوبة الإختبار السابق تجهيزها ثم يضاف عليها ٢ مل من حامض الكبرتيك ٨ ع ، حيث تسخن محتويات الأنبوبة قليلا ثم يتم قفلها بلحامها على لهب بنزن.

٢- توضع الأنابيب فى حمام رملى بداخل فرن على ١١٠ – ١٢٠ درجة مئوية ولمدة ٢٤ ساعة، حيث تبرد بعدها الأنابيب وتكسر وتنقل محتوياتها الى أنابيب الطرد المركزى، ثم يضاف اليها ٢-٥ نقطة من محلول كلوريد الباريوم المشبع ، ويجرى الطرد المركزى على ٣٠٠٠ لفة/دقيقة ولمدة ١٠ دقائق، ثم يحتفظ بالراشح فى أنبوبة زجاجية نظيفة ذات غطاء ويعاد غسيل الراسب مرة أخرى بإضافة حوالى ٢ – ٣ مل من الماء المقطر الساخن ثم الطرد المركزى كما سبق ويضم الراشح الذى يتم

الحصول عليه الى الراشح السابق.

٣- يستخدم هذا الراشح مباشرة فى تقدير الأحماض الأمينيى بأى من الطرق المتاحة أو يحفظ على – ٢٠ درجة مئوية لحـــين استخدامه فى التقدير بواسطة محلل الأحماض الأمينية.

١ – التحلل المائي القاعدي للبروتينات

Base hydrolysis of proteins

تهدف هذه التجربة إلى الحصول على بعض الأحماض الأمينية المكونة للبروتين والتى يتسبب التحلل الحامضى للبروتين فى تكسيرها مثل التربتوفان Tryptophane.

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب اختبار ١٠ سم تسحب على اللهب على بعد ٢ سم من فوهتها.
- فرن كهربى
- جهاز طرد مركزى
- موقد بنزن

المحاليل اللازمة:

- هيدروكسيد باريوم صلب أو محلول منه ٦ ع
- محلول حامض الكبريتيك ٨ ع
- محلول كلوريد باريوم مشبع
- عينات البروتين الواقعة تحت الدراسة

طريقة العمل:

١- يوزن ٠,١ جرام من البروتين المراد تحللة فى أنبوبة الاختبار السابق تجهيزها ثم يضاف عليها ٥ مل من هيدروكسيد الباريوم ٦ ع ، حيث تسخن محتويات الأنبوبة قليلا ثم يتم قفلها بلحامها على لهب بنزن.

٢- توضع الأنابيب في حمام رملي بداخل فرن على ١١٠ – ١٢٠ درجة مئوية ولمدة ٢٤ ساعة، حيث تبرد بعدها الأنابيب وتكسر وتنقل محتوياتها إلى أنابيب الطرد المركزي، ثم يضاف اليها ٢-٥ نقطة (حتى النقطة التي عندها لا يتكون أي راسب) من محلول حامض الكبريتيك ٨ ع ، ويجرى الطرد المركزي على ٣٠٠٠ لفة/دقيقة ولمدة ١٠ دقائق، ثم يحتفظ بالراشح في أنبوبة زجاجية نظيفة ذات غطاء ويعاد غسيل الراسب مرة أخرى بإضافة حوالي ٢ – ٣ مل من الماء المقطر الساخن ثم الطرد المركزي كما سبق ويضم الراشح الذي يتم الحصول عليه إلى الراشح السابق.

٣- يستخدم هذا الراشح مباشرة فى تقدير الأحماض الأميني بأي من الطرق المتاحة أو يحفظ على – ٢٠ درجة مئوية لحين استخدامه في التقدير بواسطة محلل الأحماض الأمينية..

ثانيا: تقدير الأحماض الأمينية Amino acids determination

يتم تقدير الأحماض الأمينية باستخدام جهاز محلل الأحماض الأمينية بحقن ١٠ ميكروليتر من راشح الأحماض الأمينية السابق

تجهيزه في الجهاز الذي تم تشغيله وفق البرنـــامج المخــصص لهــذا الغرض كما يلي:

العمود : PEEk, ٤,٦ x ١٥٠ mm, ٥ µm, ١٠ % cross

الطور المتحرك : المذيب الأول (A) ٥٠ ملليمولر Na_2HPO_4 ، ٧,٢ pH,
المذيب الثاني (B) عبارة عــن المــذيب A : كحــول الميثانول: تتراهيدروفيوران (THF) Tetrahydrofuran (٣٠: ٧٠: ٣).

مادة الاشتقاق : أورثو فيثالداى ألدهيد (OPA) *o*-phthaldialdehyde بمعدل سريان ٢٢ ملليلتر/ساعة ، درجة حــرارة ٥٠-٦٥ درجة مئوية.

نظام الفصــــل :

الزمن (دقيقة)	صفر	١٨	٢٤	٣٨	٤٢	٤٨
مذيب A %	٨٥	٤٨	٤٨	١٣	٥٢	صفر
مذيب B %	١٥	٥٢	٥٢	٨٧	٤٨	١٠٠

معدل الســــريان : ٠,٢ مل/دقيقة

الكشاف : فلوريسنس λ_{ex}= ٢٣٠ nm ، λ_{em}= ٤٥٠ nm

يتم حساب كمية كل حــامض أمينـــي علـــى حــدة بمقارنـــة كروماتوجرام العينة الناتج الكروماتوجرام القياسي للأحماض الأمينيـــة Standard chromatogram of amino acids.

الباب الثاني عشر

التحليل الكيميائي الإشعاعي والنووي

Nuclear and Radiochemical analysis

التحليل الكيميائي الإشعاعي والنووي
Nuclear and Radiochemical analysis

مقدمة

يغطى التحليل الكيميائي الإشعاعي والنووي العديد من التقنيات التحليلية التي تتضمن الأنوية ذات الفاعليـــة الإشـــعاعية radioactive nuclei والتى يطلق عليها النويـــات الإشـــعاعية radionuclides ، أي الأنوية التي تطلق أشعة متأينة Ionization radiation على شكل أشعة جاما gamma rays أو دقائق مشحونة. ويمكن تقدير تركيـــز كميـــات ضئيلة جدا من النويدات الإشعاعية وذلك بسبب إمكانية تقدير العمليات التي تنتج من انحلال النويدات. إضافة لذلك يمكـــن تقـــدير النويـــدات الإشعاعية لبعض العناصر بدقة عالية. وهاتان الصفتان جعلتا استخدام النويدات الإشعاعية ذات أهمية كبيرة لبعض حالات التحليل الكيميائي.

ومن أكثر استعمالات النويدات الإشعاعية في الكيمياء التحليلية بوصفها عناصر استشفافية tracers ، وذلك بفـــضل مـــا تمتـــاز بـــه النويدات الإشعاعية من قابلية كشف ونشاط إشـــعاعي لتتبـــع النـــشاط الإشعاعي للعناصر أو المركبات المعلمة أو المؤشرة بنويدات إشعاعية لعنصر ما خلال عمليات الفصل التحليليـــة. كـــذلك فهنـــاك التحليـــل بتخفيف النظائر المشعة isotope dilution analysis والـــذي يتـــضمن إضافة مركبات مؤشرة إشعاعيا radiolabelled إلى العينة التي يكـــون فيها الفصل الكمي للمادة المحللة analyte غير ممكن.

أنواع النشاط الإشعاعي

ينبعث من النويدات الإشعاعية كلا من الأشعة الكهرومغناطيسية والدقائق المشحونة حيث تصل هذه النويدات إلى الحالة المستقرة إما في خطوة واحدة أو عدة خطوات من الانبعاث في عملية تدعى بانحلال النشاط الإشعاعي radioactive decay. ويمكن استعراض أنواع الدقائق والأشعة الكهرومغناطيسية التي تنطلق عند انحلال النويدات الإشعاعية فيما يلى:

انبعاث ألفا alpha emission

يمثل انبعاث ألفا القذف من نواة جسيم ذو طاقة عالية مثل نواة الهيليوم Helium nucleus أو الراديوم Radium nucleus كما يوضحه التفاعل التالي:

$$_{88}^{226}\text{Ra} \rightarrow {}^{\text{٢}}/_{\text{٢}}\,\alpha + {}_{86}^{222}\text{Rn}$$

وتكون مسافة اختراق دقائق ألفا داخل المادة قصير بسبب ضخامتها ولكنها تسبب تأينا كبيرا خلال مسارها.

انبعاث بيتا beta emission

تتألف دقائق بيتا من إلكترونات ذات طاقة عالية تنبعث من النواة مثل انحلال التريتيوم (نظير مشع للأيدروجين) أو الكربون والتى تستخدم لتأشير المركبات العضوية كما هو موضح بالتفاعلات التالية:

$$^{٣}_{١}H \rightarrow \; ^{٠}_{-١}\beta + \; ^{٣}_{٢}H$$

$$^{١٤}_{٠}C \rightarrow \; ^{٠}_{-١}\beta + \; ^{١٤}_{٧}N$$

ونظرا لأن كل من الشحنة والكتلة لدقائق بيتا أقل من دقائق ألفا، فـــإن جسيمات بيتا يكون لديها القدرة اكثر لاختراق المادة من دقائق ألفا.

أشعة جاما Gamma radiation

تعد أشعة جاما من الأشعة الكهرومغناطيـسية ذات الأطـوال الموجية القصيرة جدا والطاقة العالية والتى تنبعث من علـى صـورة فوتونات من النواة المثـارة excited nuclear state كأحـد الوسـائل لتبديد الطاقة النووية الزائدة بدون تغير ملموس في شـحنة أو كتلـة النواة لتتحول الى الحالة المستقرة ground state كمـا هـو موضـح بالتفاعل التالى:

$$^{٢٣٦}_{٩٢}U^{*} \rightarrow \; ^{٢٣٦}_{٩٢}U + \gamma$$

ونظرا لأن كل من الشحنة والكتلة لدقائق بيتا أقل مـن دقـائق ألفا، فإن جسيمات بيتا يكون لديها القدرة اكثر لاختـراق المـادة مـن دقائق ألفا. وتكون مسافة اختراق دقائق ألفا داخل المادة قصير بـسبب ضخامتها ولكنها تسبب تأينا كبيرا خلال مسارها.

قياس النشاط الإشعاعي Measurement of radioactivity

تتفاعل أشعة ألفا وبيتا وجاما والأشعة السينية مع المادة لتعطى إلكترونات وأيونات موجبة، وكما أشرنا من قبل فإن جسيمات ألفا لهـــا فعالية عالية في إحداث التأين، وبالتالي فإن كل جسيم من جسيمات ألفا ينتج عددا أكبر من أزواج الأيونات بالمقارنة بجسيم بيتا الذي له نفس المستوى من الطاقة، في حيث أن أشعة جاما والأشعة الـــسينية تكـــون أقل فعالية في عملية التأين. وهناك العديد مـــن الكـــشافات Detectors التي تعتمد على التوصـــيل الكهربـــي التـــاثيرى induced electrical conductivity لغاز ما نتيجة لتأينه ومنها:

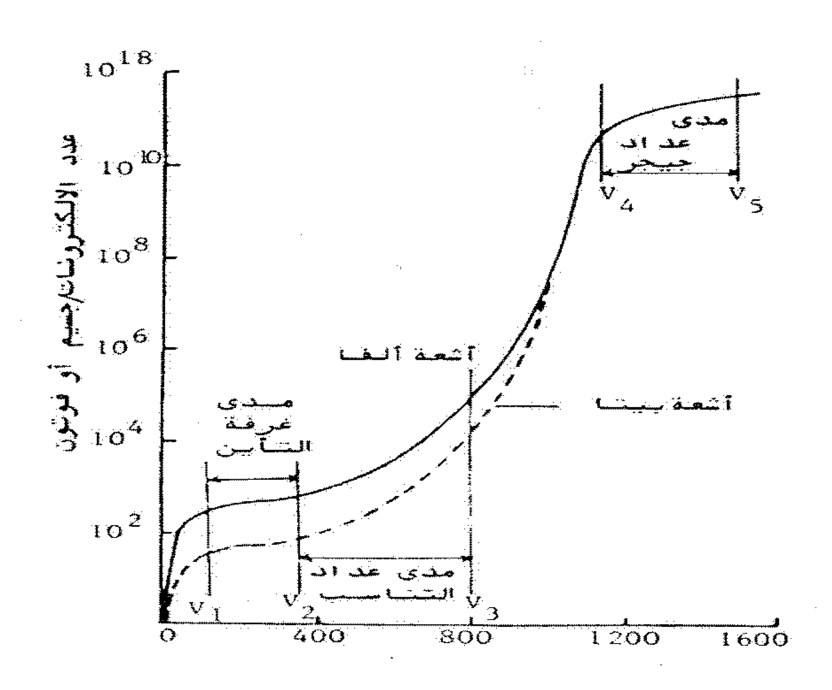
- كشاف غرفة التأين Ionization chamber
- أنابيب جيجر وميلر Geiger-Mueller tubes
- عدادات التناسب Proportional counters

والتى تتركب جميعها من غرفة لتأين الغاز كما هو موضـــح بالـــشكل التالي.

غرفة تأين الغاز في كشافات الأشعة

Radiation detectors

وتبنى نظرية تشغيل هذه الغرفة على دخول الإشـــعاعات إلـــى غرفة التأين عبر فتحة صغيرة مصنوعة من المايكا أو الألومنيـــوم أو الرصاص ، ونتيجة للتأثير المتبادل بين كل فوتون من هذه الإشعاعات والغاز الخامل (الأرجون) الموجود بالغرفة ينـــتج عـــدد مـــن أزواج الأيونات الأولية primary ion pairs قد يصل إلى عدة مئات. وتحـــت تاثير فرق الجهد المطبق تهاجر الإلكترونات تجاه المصعد الموجـــود عند محور الغرفة، بينما تتجه الكاتيونات البطيئة تجاه سطح المهـــبط. ويبين الشكل التالي تأثير فرق الجهد المستخدم على عدد الإلكترونـــات التي تتكون في غرفة التأين لكل جسيم من جـــسيمات ألفـــا أو بيتـــا، ويتضح من الشكل فرق الجهود المميزة لكـــل نـــوع مـــن الكـــشافات المستخدمة في القياس وهى على النحو التالي:



تأثير فرق الجهد ونوع الجسيم على عدد الإلكترونات المتكونة في غرفة تأين الغاز

كشاف غرفة التأين Ionization chamber

يعمل هذا الكشاف فى المنطقة المحصورة بين V_1-V_2، حيث تكون التيارات الناتجة من هذا الكشاف ضئيلة جدا (10^{-13} – 10^{-16} أمبير)، ويحتاج قياسها إلى تكبير إلكتروني عالي. ويمكن قياس إشعاعات بيتا وجاما بهذا الكشاف بعد تكبير التيار الناتج عن عملية التأين بعد ثباته.

أنابيب (كشاف) جيجر وميلر Geiger-Mueller tubes

يعمل هذا الكشاف في المنطقة المحصورة بين V_4-V_5، حيث يحدث تكبير للتيار الناتج يزيد عن 10^{9} ، وهنا ينتج كل جسيم نووي أو فوتون سيلا من الإلكترونات والكاتيونات. والتيارات الكهربية الناتجة تكون كبيرة لدرجة تسمح بكشفها وقياسها بسهولة. وتعين شدة الإشعاعات بواسطة كشاف جيجر وميلر عن طريق عد نبضات التيار الناتج.

عدادات التناسب Proportional counters

يعمل هذا الكشاف فى المنطقة المحصورة بين V_2-V_3، حيث يحدث تكبير للنبضات الناتجة عن الجسيمات النووية أو الفوتونات من 5×10^{2} الى 1×10^{5} مرة. وتعين شدة الإشعاعات عن طريق عدد الإلكترونات لكل نبضة (ارتفاع النبضة) الناتجة فى منطقة التناسب والذي يعتمد مباشرة على طاقة الإشعاعات الداخلية.

عدادات الوميض Scintillation counters

تبنى فكرة هذه الطريقة على تقدير على قياس الوميض النـــاتج من تأثير الإشعاعات على مادة فوسفورية ، وتعد هذه الطريقـــة ومـــا أدخل عليها من تحسينات من أفضل الطرق الحديثـــة للكـــشف عـــن الإشعاعات.

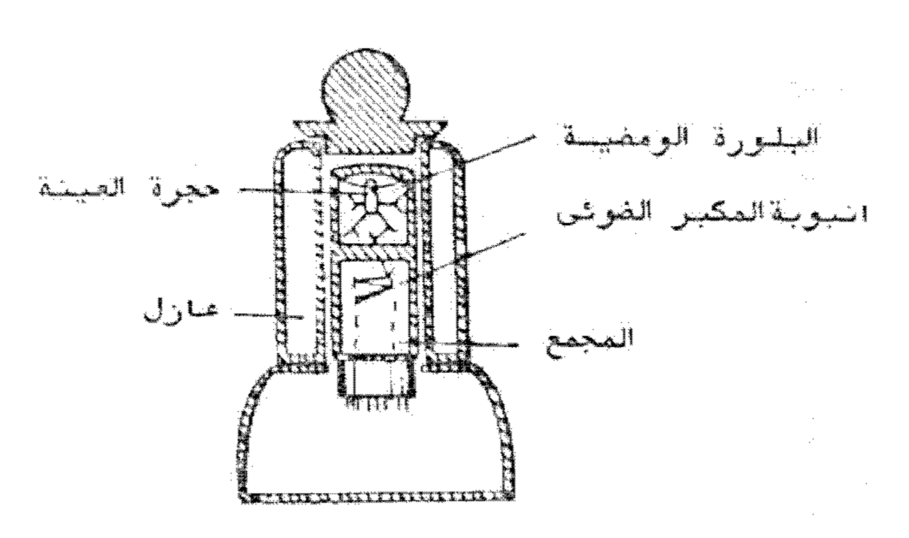
تتكون عداد الوميض من بللورة من يوديد الصوديوم المنـــشط بحوالى ١% من الثاليوم، وتكون على شكل اسطوانى بقطـــر وطـــول ٣-٤ بوصة، ويقبل أحد السطوح المستوية لهـــذه البللـــورة المهـــبط الخاص بانبوبة المكبر الضوئى photomultiplier. وعند اختراق أشعة جاما للبلورة فإنها تفقد طاقتها على البللورة وتتحرر تبعا لذلك طاقـــة على هيئة آلاف الفوتونات الضوئية أطوال موجاتها فى حـــدود ٤٠٠ نانوميتر/فوتون. تنعكس الومضات الضوئية الناتجة من البللورة الـــى مهبط المكبر الضوئى وتتحول الى نبضات كهربيـــة يمكـــن تكبيرهـــا وعدها.

وحدات النشاط الإشعاعي Radio activity units

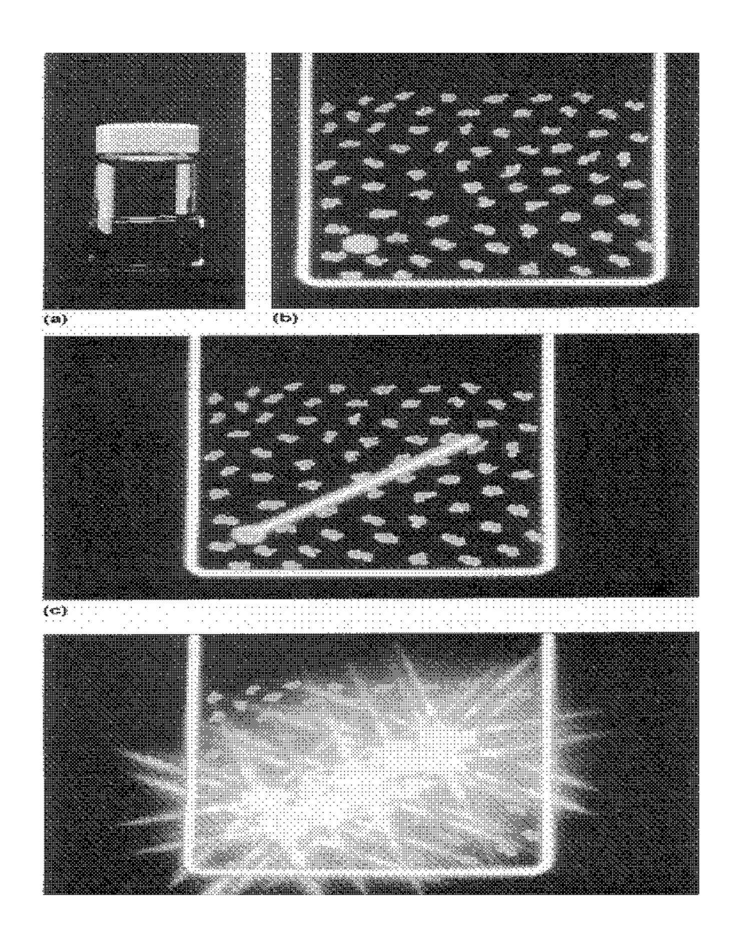
إن الصفة الكمية لمادة ذات نشاط إشعاعي يـــتم قياســـها هـــى النشاط الإشـــعاعي ويعبـــر عنهـــا بـــالانحلالات النوويـــة nuclear disintegration أو الكاونتات counts المسجلة بواســـطة العـــداد فـــي وحدة الزمن (counts/min)، ويعبر عـــن النـــشاط الإشـــعاعي عـــادة becpuerel والتى تساوى counts/sec . وحيث أن النشاط الإشـــعاعي المسجل بالعداد يتناسب طرديا مع معدل انحلال النويدات الإشـــعاعية



العداد الإشعاعي بالوميض (Liquid Scintillation counter)



شكل تخطيطي لعداد الإشعاع بالوميض (Scintillation counter)



شكل توضيحي لخطوات العد الإشعاعي باستخدام عدادات الوميض

a – أنابيب تحتوى على الفوسفور المؤشر ^{32}P.

b – جزيئات المذيب تحتوى بداخلها على جسيمات بيتا.

c – حركة جسيمات بيتا وتحفيز جزيئات المذيب.

d – تحول جزيئات المذيب المثارة إلى الحالة العادية وانبعاث الفوتونات المضيئة.

(dN/dt) حيث أن N تساوى عدد النويدات ، t تساوى وحدة الزمن، فعند مثل هذه الظروف تكون معادلة النشاط الإشعاعي على النحو التالى:

$$\text{Log} = \frac{A^{\cdot}}{A} \quad \frac{٠,٣٠١}{t\ ١/٢} \times t$$

حيث أن:

$A^{\cdot}$ = النشاط الإشعاعي عند زمن صفر

A = النشاط الإشعاعي عند زمن t

قياس درجة نشاط هرمون الثيروتروفين بواسطة الطرق الإشعاعية المناعية

Determination of thyrotrophin activity by radioimmunoassay (RIA)

نظرية العمل:

تبنى نظرية الفصل المناعي الإشعاعي RIA على أساس تكوين الراسب Formation of precipitate والتى تتلخص في الآتي: عند خلط الأنتيجين مع أجسامه المضادة في حالة غروية فيؤدى ذلك إلى اتحاد الأجسام المضادة مع المناطق الأنتيجينية وتتثبت معها فيما يعرف بالتفاعل الأولى Primary reaction، وبواسطة منطقتي الالتحام فإن جزئ الأجسام المضادة يمكن له أن يصل جزيئين من نفس الأنتيجين وهكذا تحدث اتصالات متعددة ومتفرعة بين الأنتيجينات وأجسامها المضادة مكونة شكل شبكي فيما يعرف بالتفاعل الثانوي Secondary reaction ، ثم يستمر المركب النهائي في الزيادة الحجمية إلى أن يصبح بحالة غير ذائبة ومترسبة Precipitate. وحيث أن مركبات الأجسام المضادة والأنتيجينات لا يمكنها الزيادة في الحجم بدرجة كافية لكي يتكون راسب إلا في وجو كمية كافية من الأجسام المضادة مما يصعب معه تقدير العديد من المركبات التي تتواجد في بنسبة صغيرة جدا قد تصل إلى النانوجرام أو البيكوجرام مثل الهرمونات، حيث تكون أجسامها المضادة صغيرة لإنتاج راسب. لذلك أعتمد في هذه الحالات على استخدام انتيجين مؤشر إشعاعيا (Ag^*) يتم تحضيره بطرق خاصة ثم يتفاعل مع الجسم المضاد (Ab) ليتكون ناتج مشع (Ag^* Ab) Radioactive product والذي يمكن فصلة

وتقديره باستخدام أحد الكشافات المختلفــة المتخصــصة فــي قيــاس الإشعاع، ولذلك أطلق على هذه الطريقة الفصل المنــاعي الإشــعاعي Radioimmunoassay (RIA) . وتعد هذه التقنية على درجة عالية جدا من الحساسية ، حيث يمكن بها تقدير المكونات بتركيــز جــزء فــى البليون p.p.b. أو أقل من ذلك.

الأدوات المستخدمة:

- أنابيب اختبار نظيفة جافة سعة ٢٥٠ مل.
- جهاز لضبط رقم الأس الأيدروجينى pH-meter
- جهاز طرد مركزي

المحاليل اللازمة:

- محلول أيدروكسيد الصوديوم ٥ عياري (يذاب ٢٠٠ جرام مــن أيدروكسيد الصوديوم فى لتر من الماء المقطر).
- محلول الشب البوتاسى ١٠% [يــذاب ١٠ جــرام مــن مــادة بوتاسيوم –ألومونيوم سلفات $KAl(SO_4)_2.12H_2O$ في ٩٠ مــل من الماء المقطر.
- محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩% (يذاب ٩ جرام مــن كلوريــد الصوديوم فى لتر من الماء المقطر).
- محلول المرثيولات ٠,٠١ % (يــذاب ٠,١ جــرام مــن مــادة المرثيولات Sodium ethyl mercury thiosalicylate في لتر من الماء المقطر).
- محلول فوسفاتي منظم ذات درجة pH = ٧,٢.

- الهرمون المؤشر *TSH

- الهرمون القياسي Human TSH standard

أولا: تحضير الأجسام المضادة عديدة التكافؤ

Preparation of polyvalent anti-human serum protein

١- يتم سحب عينات الدم من عدة أشخاص أصـــحاء، ويـــتم فـــصل المصل عن كرات الدم الحمراء بواسطة الطرد المركـــزي، ثـــم تخلط الأمصال مع بعضها ليتكون الــ pooled serum.

٢- ينقل ٢٥ مل من مصل الدم إلى أنبوبة اختبار كبيرة (٢٥٠ مـــل) ثم يضاف إليها ٨٠ مل ماء مقطر + ٩٠ مل من محلول الـــشب البوتاسى ١٠% ، ثم يتم ضبط درجة حموضة المحلـــول حتـــى درجة pH = ٦,٥ بالاستعانة بمحلول أيدروكـــسيد الـــصوديوم ٥ عياري.

٣- توضع أنابيب الاختبار في جهاز الطرد المركزي ويدار الجهـــاز على سرعة ٣٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، ثم يتم فصل الراسب المتكون وغسيله مرتين بواسطة مخلوط مـــن محلـــول كلوريـــد الصوديوم (٠,٩ %) + محلول المرثيولات (٠,٠١%).

٤- يذاب الراسب الناتج في ١٠٠ مل مـــن المحلـــول الفـــسيولوجى السابق (مخلوط من محلول كلوريد الصوديوم ٠,٩ % + محلول المرثيولات ٠,٠١%) والذي يظهر علـــى شـــكل معلـــق يمكـــن الاحتفاظ به لفترة أقصاها ١٤ يوم على درجة ٤ درجة مئوية.

٥- يتم حقن حيوانات التجارب (الأرانب) بالمحلول السابق بالنظـــام

التالي:

اليوم الأول	يحقن ٥ مل من المخلوط الغروي في كل من عضلة الفخذ.
اليوم الرابع عشر	يحقن ٥ مل من المخلوط الغروي في كل من عضلة الفخذ.
اليوم الرابع والعشرين	يحقن ١ مل من مصل الدم pooled serum في البطن.
اليوم الرابع والثلاثين	يتم سحب عينات الدم من وريد أذن الأرنب (٤٠ مل لكل أرنب).

٦- ويمكن تكرار هذا العمل لعدة مرات بين المرة والأخرى فترة راحة تتراوح ٢-٣ أسابيع. ثم تترك عينات الدم المسحوبة على درجة حرارة الغرفة لمدة ١-١ز٥ ساعة ثم لمدة ٨ ساعات عند درجة – ٤ درجة مئوية.

٧- يتم فصل مصل الدم المحتوى على الأمصال المضادة بواسطة الطرد المركزي في اليوم التالي ، ثم يخزن في أوعية صغيرة Vials يحتوى كل منها على ٢-٣ مل وتحفظ على درجة –٢٠ درجة مئوية.

ثانيا: تنقية الأمصال المضادة

Purification of polyvalent anti-human serum protein

١- يوضع حجم معين من محتوى مصل الدم في أنبوبة اختبار + حجم مماثل من المحلول الفوسفاتي المنظم pH (٧,٢) ، ثم يضاف ٢٠% محلول كبريتات الأمونيوم المشبع.

٢- يتم فصل الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي ثم يكمل المحلول الرائق بنسبة ٤٠% من محلول كبريتات الأمونيوم المشبع ثم يجرى الفصل باستخدام جهاز الطرد المركزي للحصول على الراسب.

٣- يجرى فصل للراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي، ثم يتم إذابة الراسب الناتج في المحلول الفوسفاتي المنظم pH (٧,٢) ثم يكمل بمحلول كبريتات الأمونيوم المشبع ٣٥%.

٤- يتم تنقية المحلول السابق بواسطة التحليل المائي الغشائي وذلك بوضع المحلول بداخل غشاء نصف منفذ لمدة ٤٨ ساعة في المحلول المنظم.

٥- يركز المحلول بعد ذلك بنسبة ١:١٠ من الحجم الأصلي، حيث يحتوى المحلول الناتج على المركز النقي لمضاد الأنتيجين .

ثالثا: تقديرعيارية مضاد الأنتجين Titre of antigen

١- يضاف حجم ثابت من المحلول المحتوى على مضاد الأنتيجين إلى عدد من أنابيب الاختبار، ثم يضاف تدريجيا أحجام مختلفة من الأنتيجين النوعي داخل الأنابيب المحتوية على مضاد الأنتيجين.

٢- يثبت الحجم بداخل الأنابيب بإضافة المحلول الفسيولوجى لكلوريد

الصوديوم، ثم توضع الأنابيب في الحضان على درجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ساعة ، ثم توضع في الثلاجة على درجة ٤٨ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

٣- يتكون راسب من البروتين في الأنابيب تتوقف كمية على وجود نسبة عالية وقوية من الجسم المضاد (مضاد الأنتيجين) والذي يستخدم بعد ذلك فى الكشف على نفس مادة الأنتيجين وتقدير كميتها بطريقة الإشعاع المناعي (Radioimmunoassay (RIA.

رابعا: تأشير الهرمون المراد قياسة TSH - labellization

١- يتم تأشير الهرمون TSH باستخدام اليود ^{125}I حيث يكون النشاط الإشعاعي له في حدود ٧٦ (mci/mg) أي ما يوازى ٢,٨ (MBq/µg) والذي يكافئ أيضا ذرة واحدة من اليود الحامل الحر carrier-free iodine لكل جزئ TSH. ويتم تأشير المركبات الكيميائية بصفة عامة عند بقايا الحامض الأميني التيروزين Tyrosine ، وفى حالة عدم احتواء بعض المركبات مثل الهومونات على بقايا التيروزين فإنه يتم تأشير التيروزين بالمادة المشعة ثم يضاف الى جزئ المادة على النحو التالى:

١- يحث جزئ الكلورامين-ت Chloramine-T ليتحرر ببطيء HOCl والذي يتفاعل بعد ذلك مع NaI^* ليتكون المركب HOI^* . يتم تفاعل المركب الأخير مع الحامض الأميني التيروزين حيث تدخل المجموعة OI^* عند الوضع ٤. يضاف بعد ذلك التيروزين المؤشر إلى الأنتيجين (هرمون THS) ليتكون الأنتيجين المؤشر Ag^* للهرمون THS^* كما هو موضح بالشكل التالي:

$$H_3C-C_6H_4-SO_2-N(Cl)Na \xrightarrow{H_2O} HOCl$$

$$HOCl + NaI^* = HOI^*$$

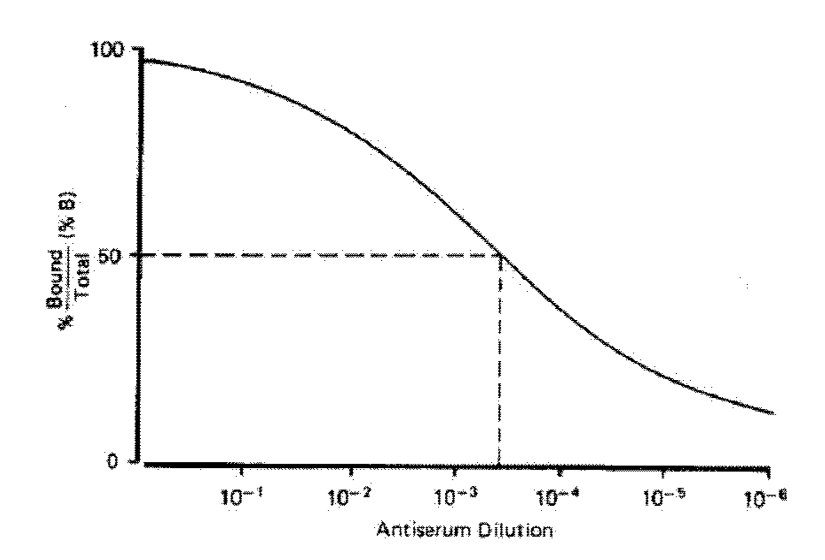
$$HOI^* + C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH \xrightarrow{80-95\%} {}^*IO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

Ag*

٢- ويمكن إجــراء تنقيــة للهرمــون المؤشــر باســتخدام العمــود الكروماتوجرافى على الــسيفادكس Column chromatography on Sephadex G١٠٠ ثم يخزن بعد ذلك في محلــول الفوســفات المنظم (٥٠ ملليمول/لتر عند درجة pH ٧,٥) علــى درجــة ٤ درجة مئوية. ويمكن استخدام الهرمون المؤشر وهو مخزن على حالته هذه لمدة ١٠ أسابيع.

خامسا: تحضير المنحنى القياسي TSH –standard curve

يتم عمل سلسلة من التخفيفات للأنتيجين الغير مؤشر Human TSH القياســـي ٢ nd International Reference Preparation (IRP, Code ٨٠L٥٥٨) وذلك بهدف عمل المنحنى القياسي Standard curve كما يوضحه الشكل التالي:



سادسا: فصل الأنتجينات الحرة والمرتبطة وتقديرها

Separation and determination of free and bound antigen

يتم فـصل الأنتيجـين المـرتبط Bound antigen (B) عـن الأنتيجين الحر Free antigen (F) باستخدام أحد التقنيات التالية:

١- تجهيـز الأعمـدة الكروماتوجرافيـة أو وحـدات الألكتروفوريسيس التي تعتمد على اختلاف معامـل الهجـرة Differential migration بين الأنتيجين المرتبط والأنتيجـين الحر.

٢- تجهيز الأعمدة الكروماتوجرافية التـي تقـوم بإدمـصاص الأنتيجين الحر Adsorption of free antigen مثـل عمـود الدكستران المغطـى بـالفحم الحيـواني Dextran-coated

charcoal أو راتنجات التبادل الأيونى Ion-exchange resins
.

٣- يتم قياس كمية المادة المشعة المحملة على كل من الأنتيجـــين المرتبط والحر المفصولة باســـتخدام إحـــدى طـــرق قيـــاس الإشعاع السابق شرحها، ثم يتم حساب تركيز الأنتيجين TSH بالاستعانة بالمنحنى القياسي السابق إعداده.

قائمة المراجع

قائمة المراجع

المراجع الأجنبية:

Alltech Associates, Inc. (١٩٩٧).Catalog-٤٠٠, Chromatography, State College, PA, USA.

Barrett, G.C. (١٩٨٥). Chemistry and Biochemistry of Amino Acids. Chapman and Hall, New York, USA.

Bender, G.T. (١٩٨٧). Principles of Chemical Instrumentation.W.B. Saunders Company, London, UK.

Brown, P.R. (١٩٧٣). High Pressure Liquid Chromatography, Academic Press, New York, USA.

Champe, C.P. and Harvey, A.R. (١٩٩٤). Biochemistry. ٢ nd edition, J.B.Lippincott Company, Philadelphia, USA.

Elhassaneen, Y.A. (٢٠٠٢). Training cource in Analytical Chromatography (HPLC & HPTL). Fac. of Science (Beni Suef), Cairo University, Egypt.

El-Saadany, M.A. (٢٠٠١). The Effect of Dietary Phytochemicals on the Prevention of Liver Cancer Initiation Induced by some Chemical Carcinogenesis. M.Sc. Thesis, Fac .of Home Economics, Minufiya Univ., Shebin el-Kom, Egypt.

Hewlett Packard (١٩٨٧). Fundamental of Liquid Chromatography. Training Material, Prod.- No. H٤٠٢٣A., Germany.

Holm, D.J. and Peck, H. (١٩٩٣). Analytical Biochemistry. ٢ nd Ed., Longman, singapore.

Matissek, R. and Wittkowski (١٩٩٣). High Performance Liquid Chromatography in Food Control and Research,

Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania, USA.

Snell, K. and Mullock, B.(١٩٨٧). Biochemical Toxicology: a practical approach. IRL Press, Washington, USA.

Stroev, E.A. and Makarova, V.G.(١٩٨٩). Laboratory Manual in Biochemistry. MIR Publishing, Moscow.

Varley, H. (١٩٨٨). Practical Clinical Biochemistry. ٤ th Ed.CBS Publishers and Distributors, New Delhi, India.

Voet, D. and Voet, J. (١٩٩٠). Biochemistry. John Wiley&Sons,New York, USA.

المراجع العربية:

- عبد المنعم محمد الأعسر (١٩٨٧). التحليل الطيفي للأنظمة الكيميائية – دار البحر الأبيض المتوسط للنشر – القاهرة- مصر.
- عبد الرحمن أحمد الحملاوى (١٩٨٩). الكيمياء الحيوية العملية مع مختارات من الكيمياء العضوية العملية – دار القلم للنشر والتوزيع – الكويت.
- رضوان صدقى فرج (١٩٩٠). التحليل الكروماتوجرافى – مركز النشر لجامعة القاهرة – القاهرة – مصر.
- عبد الغنى حمزة (وآخرون) (١٩٩٢). الكيمياء التحليلية: تجارب عملية فى التحليل الآلى – مركز النشر العلمى – جامعة الملك عبد العزيز- المملكة العربية السعودية.

فهرس الموضوعات

المحتويات

الباب الخامس

كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة

الباب السادس

الفصل الكروماتوجرافى باستعمال الأعمدة

الباب السابع

الفصل الكهربي

الباب الحادي عشر

محلل الأحماض الأمينية

الباب الثاني عشر

التحليل الكيميائي الإشعاعي والنووي